

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

**Entwicklung und Charakterisierung von Enzymimmuntests für den
Nachweis von Fluorchinolonen**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Andreas Gärtner
aus
Erfurt

München 2006

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

Dekan : Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Heinritzi

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

*Meiner Großmutter
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	CHARAKTERISTIKA DER FLUORCHINOLONE.....	2
2.1.1	GESCHICHTE DER FLUORCHINOLONE	2
2.1.2	STRUKTUR UND SYNTHESE	3
2.1.3	WIRKUNGSSPEKTRUM.....	5
2.1.4	WIRKUNGSPRINZIP	6
2.1.5	RESISTENZSITUATION	8
2.1.6	PHARMAKOKINETIK.....	9
2.1.7	UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN.....	10
2.2	RÜCKSTÄNDE VON FLUORCHINOLONEN IN LEBENSMITTELN TIERISCHEN URSPRUNGS	11
2.3	NACHWEISVERFAHREN.....	14
2.3.1	MIKROBIOLOGISCHE NACHWEISVERFAHREN	14
2.3.2	CHEMISCH-PHYSIKALISCHE NACHWEISVERFAHREN	15
2.3.2.1	Chromatographische Nachweisverfahren.....	15
2.3.3	IMMUNOLOGISCHE NACHWEISVERFAHREN	18
2.3.3.1	Enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Fluor-chinolonen.....	19
2.3.4	ALTERNATIVE TESTFORMATE.....	22

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	23
3.1	MATERIALIEN UND GERÄTE	23
3.1.1	CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKA.....	23
3.1.2	CHINOLONE	23
3.1.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	24
3.1.4	IMMUNREAGENZIEN.....	25
3.1.5	PROBENMATERIAL.....	25
3.1.6	GERÄTE.....	25
3.1.7	SONSTIGE MATERIALIEN	26
3.2	METHODIK UND ERGEBNISSE.....	26
3.2.1	HERSTELLUNG DER IMMUNREAGENZIEN.....	26
3.2.1.1	Glutardialdehydmethode	27
3.2.1.2	Natriumperjodatmethode.....	28
3.2.1.3	Carbodiimidmethode.....	29
3.2.1.4	Aktive Estermethode.....	30
3.2.2	CHARAKTERISIERUNG DER KONJUGATE	33
3.2.3	GEWINNUNG SPEZIFISCHER ANTISEREN	34
3.2.3.1	Immunisierung.....	34
3.2.3.2	Serumgewinnung	35
3.2.3.3	Immunisierungsverlauf	35
3.2.4	ETABLIERUNG KOMPETTIVER ENZYMIMMUNTESTS ZUM NACHWEIS VON FLUORCHINOLONEN	37
3.2.4.1	Direkter kompetitive Enzymimmuntests.....	37
3.2.4.2	Direkter kompetitive Enzymimmuntests unter Verwendung eines zweiten Antikörpers als Festphase	39

III

3.2.4.3	Indirekte kompetitive Enzymimmuntests.....	39
3.2.4.4	Sensitivität der etablierten Enzymimmuntests	41
3.2.4.5	Spezifität des Antiserums.....	44
3.2.5	ENTWICKLUNG EINES AGARDIFFUSIONSTESTS ZUM NACHWEIS VON FLUORCHINOLONEN	46
3.2.5.1	Etablierung eines Agardiffusionstests.....	47
3.2.6	ANWENDUNG DER ENZYMIMMUNOLOGISCHEN VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON FLUORCHINOLONEN	51
3.2.6.1	Untersuchung von Milch.....	51
3.2.6.1.1	Optimierung des Enzymimmuntests/Probenvorbereitung	51
3.2.6.1.2	Untersuchung künstlich und natürlich kontaminierter Milch.....	51
3.2.6.2	Untersuchung von Garnelen	53
3.2.6.2.1	Optimierung des Enzymimmuntests	53
3.2.6.2.2	Extraktion der Proben	54
3.2.6.2.3	Bestimmung der Wiederfindungsraten und Untersuchung von Garnelenproben	54
4	DISKUSSION.....	56
4.1	ENTWICKLUNG ENZYMIMMUNOLOGISCHER NACHWEISVERFAHREN.....	57
4.2	MODIFIZIERTER AGARDIFFUSIONSTEST	60
4.3	UNTERSUCHUNG VON MILCH UND GARNELEN.....	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	65

Abkürzungsverzeichnis

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
EDPC	1-Ethyl-3-(Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid
EIA	Enzymimmunoassay
GlcOx	Glucoseoxidase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LC	Flüssigkeitschromatographie
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
TMB	Tetramethylbenzidin
VK	Variationskoeffizient
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

Chinolone stellen als systemische Chemotherapeutika eine Gruppe von Wirkstoffen dar, die mit einem breiten antimikrobiellen Wirkspektrum sowohl grampositive als auch gramnegative Mikroorganismen, darunter auch Chlamydien und Mykoplasmen, erfassen. In der Humanmedizin stellen sie oft das Mittel der ersten Wahl dar, in der Tiermedizin kommen sie häufig prophylaktisch zur Vermeidung von Erkrankungen bei größeren Tierbeständen bzw. metaphylaktisch oder therapeutisch bei klinisch manifesten bakteriellen Erkrankungen zur Anwendung. Durch den breiten Einsatz dieser Antibiotika ist in Lebensmitteln tierischen Ursprungs stets die Gefahr der Rückstandsbildung gegeben.

Zum Schutz des Verbrauchers wurden daher für einige Substanzen aus der Gruppe der Chinolone (Enrofloxacin, Danofloxacin, Marbofloxacin, Difloxacin, Sarafloxacin, Oxolinsäure und Flumequin) EU-weit Höchstmengen für von Tieren stammende Lebensmittel festgesetzt (sog. Maximum Residue Limits [MRLs]), deren Einhaltung mit geeigneten Untersuchungsverfahren kontrolliert werden muss. In der amtlichen Routinediagnostik sind derzeit HPLC-Methoden vorgesehen, die jedoch sehr kosten- und zeitintensiv sind und eine aufwendige Probenaufarbeitung bedingen. Die im Rahmen der Milchgüteverordnung durchgeführten Hemmstoff-Kontrollen mittels Agardiffusionstest (z.B. Brillantschwarz-Reduktionstest) weisen eine schlechte Sensitivität für Chinolone auf und ermöglichen keine Identifizierung und Quantifizierung der Hemmstoffe.

Enzymimmunologische Verfahren dagegen zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität, sowie schnelle und einfache Durchführung aus. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis der am häufigsten vorkommenden Chinolone zu entwickeln. Dabei standen im Hinblick auf die Erfassung der jeweiligen Höchstmengen die Sensitivität bzw. im Hinblick auf die strukturelle Heterogenität dieser Substanzgruppe die Spezifität des Testverfahrens im Mittelpunkt der Untersuchungen. Zudem sollte die Anwendbarkeit des Verfahrens bei verschiedenen Probenmatrices demonstriert werden.

2 SCHRIFFTUM

2.1 Charakteristika der Fluorchinolone

2.1.1 *Geschichte der Fluorchinolone*

Nachdem sich ein Zwischenprodukt der Chloroquin-Synthese Anfang der sechziger Jahre als antibakteriell wirksam erwiesen hatte, wurde 1962 der Wirkstoff Nalidixinsäure (Abbildung 1) unter dem Handelsnamen Nogram® zur Behandlung von Harnwegsinfektionen in der Humanmedizin eingeführt. Da dieser Wirkstoff jedoch schlecht resorbiert wurde, nur ein enges Spektrum von Erregern erfasste und sehr schnell Resistenzen auftraten, erlangte dieses Medikament keine große Bedeutung. Erst durch die Variation des Substitutionsmusters am Grundgerüst konnten weitaus wirksamere Antibiotika hergestellt werden, die heute breit eingesetzt werden (APPELBAUM und HUNTER, 2000).

Ein wichtiger Meilenstein in der Geschichte der Gyrasehemmstoffe stellt die Synthese der Pipemidsäure (Abbildung 1) dar, die auf Grund des zusätzlichen Piperazin-Rings eine deutlich verbesserte Pharmakokinetik und Wirksamkeit zeigte. Die Einführung des Fluoratoms in Position 6 des Chinolon-Grundgerüsts stellte einen weiteren Durchbruch dar. Abbildung 2 zeigt einige Beispiele für diese als Chinolon-Antibiotika der 2. Generation bzw. auch als Fluorchinolone bezeichnete Substanzgruppe. Deren erster Vertreter war das 1984 in den Handel gebrachte Norfloxacin, das eine gute Bioverfügbarkeit aufwies, eine längere Halbwertszeit hatte und ein breiteres Erregerspektrum, insbesondere im gramnegativen Bereich, erfasste (STEIN, 1988).

In den darauf folgenden Jahren wurden dann schnell nacheinander Ofloxacin, Ciprofloxacin, Enoxacin und Pefloxacin auf den Markt gebracht. Ciprofloxacin und Ofloxacin, die auch gegen grampositive Keime wirksam sind, können als die potentesten Mittel dieser Gruppe angesehen werden. Neuere Chinolone sind Moxifloxacin und Gatifloxacin, die sich durch eine sehr hohe antibakterielle Wirksamkeit auszeichnen.

2.1.2 Struktur und Synthese

Die meisten Vertreter dieser Antibiotika-Gruppe weisen als Grundgerüst ein Chinolin-Ringsystem auf (Abbildung 1), dementsprechend wird häufig der Begriff „Chinolon-Antibiotika“ verwendet. Durch die Einführung einer Ketogruppe in Position 4 und einer Carboxylgruppe in Position 3 entstehen Verbindungen, die bedingt durch diese funktionellen Gruppen eine erhöhte Affinität für die bakterielle Gyrase aufweisen. Obwohl der Begriff „Chinolone“ nicht in jedem Fall im Sinne der chemischen Nomenklatur ganz korrekt ist, hat er sich heute in der medizinischen Chemie durchgesetzt. Neben dem Chinolin werden zur Synthese dieser Antibiotika auch andere heterozyklische Verbindungen wie Naphthyridin- und auf Pyrimidin basierende Ringsysteme eingesetzt. Auf diesem Grundgerüst basiert auch das erste therapeutisch eingesetzte 4-Chinolon, die Nalidixinsäure. Da sich die Nalidixinsäure nur sehr bedingt zur Pharmakotherapie eignete, versuchte man, durch Hinzufügen verschiedener Substituenten diese Eigenschaften zu verbessern (PETERSEN, 2001). Dies gelang insbesondere durch die Einführung eines Piperazins in der C-7-Position der entsprechenden Heterozyklen. So entstand beispielsweise die Pipemidsäure (siehe Abbildung 1).

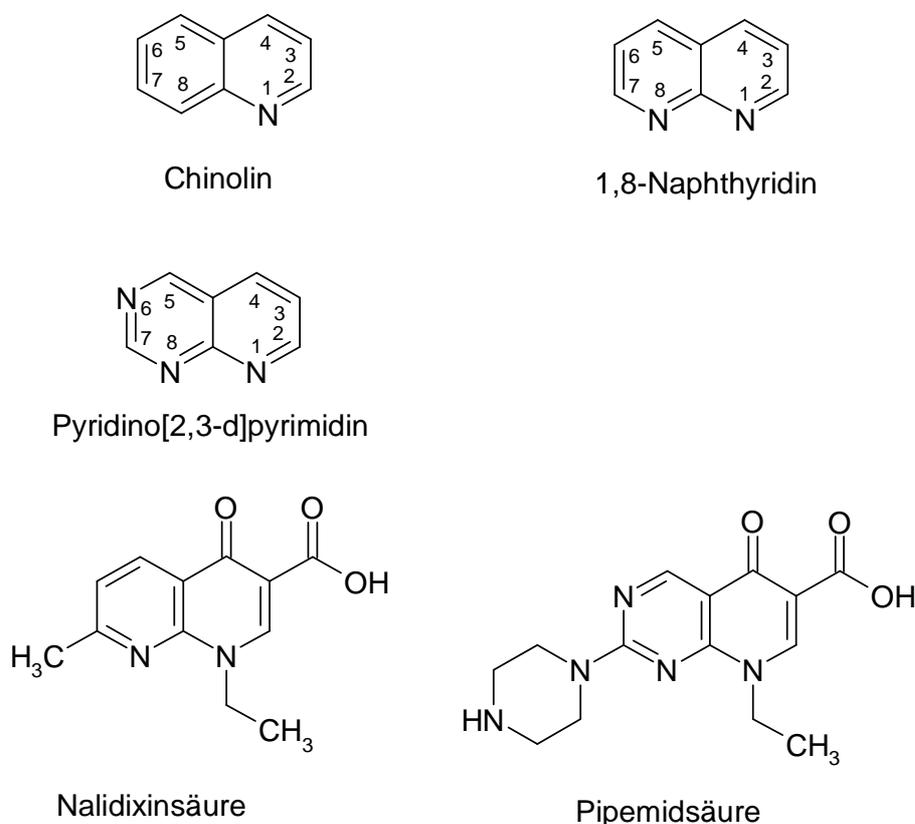


Abbildung 1: Grundstrukturen der Gyrasehemmer

Eine weitere Modifikation stellte die Einführung eines Fluoratoms als Substituent in Position 6 des Grundgerüsts dar. Mit der Kombination der Substituenten in Position 6 (Fluoratom) und Position 7 (Piperazin) entstand eine neue Gruppe der 4-Chinolone. Diese wichtigsten Vertreter der Chinolone werden wegen des Fluoratoms in Position 6 auch als Fluorchinolone bezeichnet und repräsentieren die 2. Generation dieser Antibiotikagruppe. Der erste im Handel befindliche Vertreter dieser Gruppe war das Norfloxacin. Schnell kamen weitere heute wichtige Vertreter wie Ofloxacin (1985), Ciprofloxacin (1987) und Sparfloxacin (1997) hinzu. Für die Veterinärmedizin stand mit Enrofloxacin (Baytril®) 1980 das erste Fluorchinolonpräparat zur Verfügung (GROHE, 1998). Weitere für die Veterinärmedizin wichtige Fluorchinolone folgten mit Marbofloxacin (Marbocyl®) und Danofloxacin (Advocid®). In Abbildung 2 sind einige wichtige Fluorchinolone dargestellt.

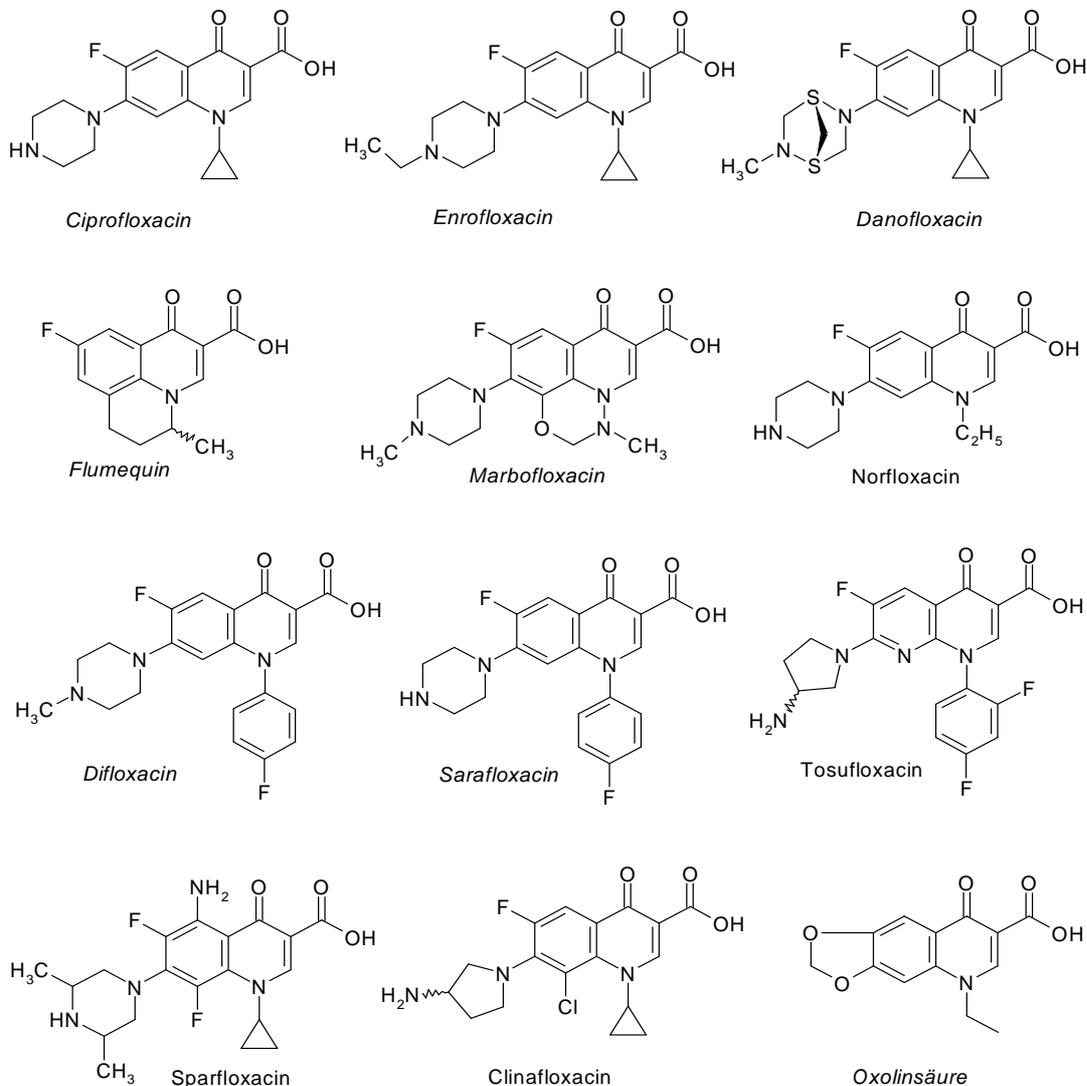


Abbildung 2: Strukturformeln wichtiger Fluorchinolone (kursiv geschriebene Chinolone sind mit einem MRL-Wert belegt)

2.1.3 Wirkungsspektrum

Nach NABER und ADAM (1998) lassen sich antibakteriell wirksame Substanzen nach folgenden Kriterien einteilen: Zeitpunkt der Zulassung, chemische Struktur, antibakterielles Spektrum, Pharmakokinetik, Indikationen, Verträglichkeit, Applikationsformen etc. Die historisch-chronologische Klassifizierung ist oft wenig hilfreich, da der Zeitpunkt der Zulassung einer Substanz über ihre Stellung innerhalb der Klasse wenig aussagt. Deshalb ist eine Unterteilung, z.B. in Gruppen, unabhängig von der zeitlichen Zulassung vorzuziehen.

Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG, 1998) hat die 4-Chinolone in vier Gruppen steigender Wirksamkeit eingeteilt. Hierbei wurden allerdings nur Vertreter der 2. Generation der Chinolone wie Norfloxacin und Ciprofloxacin berücksichtigt, da die 1. Generation wie z. B. Nalidixinsäure mit einigen Ausnahmen nur noch von historischem Interesse ist. Manche der in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen sind heute nicht mehr im Handel, so dass in den Gruppen 3 und 4, in die die 4-Chinolone der höchsten Wirksamkeit eingeordnet werden, jeweils nur zwei Wirkstoffe zur Verfügung stehen. Es sei darauf hingewiesen, dass die 4-Chinolone der Gruppe 3 und 4 laut RODLOFF et al. (1999) zum Teil gegen gramnegative Keime nicht so wirksam sind wie die Gyrasehemmer der Gruppe 1 und 2.

Tabelle 1: Einteilung der 4-Chinolone nach Gruppen (Empfehlung der PEG)

Gruppe	Indikation	Keime	4-Chinolone
1. Orale 4-Chinolone zum Einsatz bei Harnwegsinfektion	Harnwegsinfekte, bakterielle Enteritiden, Gonorrhoe, Prostatitis	Gramnegative Bakterien	Norfloxacin Pefloxacin
2. Systemisch anwendbare 4-Chinolone mit breiter Indikation	Harnwegsinfekte, Atemwegsinfekte (gramnegativ), Haut-, Weichteil- und Knocheninfektion	wie Gruppe 1 und Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken, Enterokokken	Enoxacin Fleroxacin Ofloxacin Ciprofloxacin
3. 4-Chinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und atypische Erreger	(Harnwegsinfektionen) Atemwegsinfektionen (Primärtherapie!), Gonorrhoe, Urethritis, Zervizitis	wie Gruppe 1+2 und Chlamydien, Mykoplasmen	Levofloxacin Sparfloxacin <i>Grepafloxacin</i>
4. 4-Chinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive atypische Erreger sowie gegen Anaerobier	Haut-, Weichteil-, Knocheninfektion, abdominale Infektionen, systemische Infektionen, Sepsis, Meningitis	wie Gruppe 1-3 und Anaerobier	Gatifloxacin <i>Trovafloxacin</i> Moxifloxacin <i>Clinafloxacin</i>

Die kursiv geschriebenen Stoffe wurden zwischenzeitlich vom Markt genommen

2.1.4 Wirkungsprinzip

Der Wirkungsmechanismus aller Fluorchinolone ist identisch. 4-Chinolone wirken bakterizid, indem sie das den Bakterien eigene Enzym Gyrase hemmen (GOSS et al., 1964). Daher werden die 4-Chinolone auch als Gyrasehemmer bezeichnet. Die Gyrase gehört zu den Topoisomerasen und ist für die räumliche Anordnung der Nukleinsäuren in der Zelle ver-

antwortlich. Es gibt mehrere Topoisomerase-Arten. Die Topoisomerase II, auch Gyrase genannt, sorgt durch eine starke Verdrillung der DNA (Supercoiling) dafür, dass der 1 mm lange DNA-Faden überhaupt in die 1 μm große Bakterienzelle passt (HOLZGRABE, 2004). Der Prozess des Supercoiling umfasst das Auftrennen des DNA-Doppelstranges, das Drehen des Stranges um die Helixachse und das Wiederverknüpfen der DNA.

In Folge der durch die Ketogruppe in Position 4 und die Carboxylgruppe in Position 3 vermittelten Bindung der Chinolon-Antibiotika an den DNA-Topoisomerase II Komplex, wird dieser Enzymkomplex gehemmt (HAWKEY, 2003). Bis heute ist der genaue molekulare Mechanismus der Gyrasehemmung nicht bekannt. Nach einem Modell von SEHN et al. (1989) lagern sich die Fluorchinolone als Nucleosid-ähnliche Verbindungen so zwischen die Basenpaare der DNA, dass ein ternärer Komplex aus DNA, Gyrase und 4-Chinolon entsteht. Dieser Komplex ist relativ stabil und verhindert das Ablesen der Nucleinsäure (SEHN und CHU, 1996). Eine Vermehrung der DNA kann nicht mehr stattfinden, da die Polymerasen (Replikationsenzyme) über diesen Komplex nicht hinweglesen können. Auch die Reparaturmechanismen der Bakterienzellen können auf Grund der Stabilität des Komplexes den Defekt nicht beseitigen. Dadurch werden Kaskaden enzymatischer Reaktionen ausgelöst, die zum Zelltod führen. Während das primäre Ziel für Chinolone bei gramnegativen Bakterien die Gyrase ist, stellt bei grampositiven Bakterien ein anderes Enzym, die Topoisomerase IV die primäre Zielstruktur dar. Dieses Enzym ist für die Trennung der prokaryontischen Chromosomen nach der Replikation verantwortlich. Wird dieses Enzym gehemmt, bleiben die Tochterchromosomen miteinander verbunden und können in der Tochterzelle nicht verteilt werden (WIEDEMANN, 1999). Dabei bilden die 4-Chinolone mit der DNA und der Topoisomerase IV ebenfalls einen ternären Komplex, der ähnlich wie bei der Gyrase die weitere Vermehrung der Bakterienzelle verhindert (SEHN et al., 1997).

2.1.5 Resistenzsituation

Für die Entstehung von Resistenzen gegen Fluorchinolon-Antibiotika sind laut WIEDEMANN und HEISIG (1999) verschiedene Mechanismen verantwortlich. Zum einen kann durch eine Mutation der Gyrase-Gene die Bindung der 4-Chinolone an die DNA verhindert werden. Hieraus resultierten Kreuzresistenzen gegen alle 4-Chinolone. Da diese Resistenz chromosomal codiert ist, wird sie langsamer verbreitet als Resistenzformen bei anderen Antibiotikagruppen (WIEDEMANN und HEISIG, 1999), die durch Plasmide übertragen werden. Ein zweiter Resistenzmechanismus beruht darauf, dass üblicherweise Chinolone mit Hilfe von Porinen - Transportproteine die die äußere Membran gramnegativer Bakterien durchspannen - in die Bakterienzelle gelangen. Bei resistenten Keimen wurde eine verminderte Bildung dieser Porine gefunden, was die 4-Chinolon-Konzentration in der Bakterienzelle senkt. Zusätzlich wird bei dieser Resistenzform ein erhöhter aktiver Auswärtstransport der 4-Chinolone durch die Exprimierung von Effluxproteinen beobachtet (LEHN et al., 2002). Eine Reihe solcher „Multidrug-Resistance-Effluxproteine“ sind in der letzten Zeit charakterisiert worden, zum Beispiel die NorA-MDR-Pumpe, die bei Chinolonresistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen nachgewiesen wurde. Diese Pumpe transportiert hydrophobe Kationen, wie beispielsweise am Piperazinring protoniertes Norfloxacin, aus der Bakterienzelle. Durch den Einsatz von 5-Methoxyhydrocarpin, eine Substanz, die aus *Berberis fermontii* isoliert wurde, kann der Auswärtstransport sowohl von Berberin, dem natürlichen Substrat der Pumpe, als auch von Norfloxacin gehemmt werden (BRENWALD et al., 1998, STERMITZ et al., 2000). Die Substanz, die selbst keine antibakterielle Aktivität aufweist, potenziert den Berberin- und Norfloxacin-Effekt, wodurch die Resistenz überwunden wird. Von weiteren Effluxpumpenhemmern berichteten RENAU et al. (1999).

Prinzipiell ist die Resistenzlage bei Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen Antibiotika als relativ günstig anzusehen. So sind beispielsweise nur 14,5 % der *E. coli*, 6 % der *Klebsiella pneumoniae* und 4,4 % der *Proteus mirabilis* Stämme gegen Ciprofloxacin resistent (KRESKEN et al., 2003; RODLOFF et al., 1999). Andererseits wird seit etwa zehn Jahren ein Anstieg der Resistenzen bestimmter Keimgruppen gegenüber Fluorchinolonen beobachtet. Ein Beispiel hierfür sind *Campylobacter*-Stämme, die beim Tier selten Erkrankungen auslösen, beim Menschen jedoch schwere Magen-Darm-Infektionen hervorrufen können. Die

Resistenzlage ist hierbei regional sehr unterschiedlich: In Dänemark wurden kaum resistente Keime gefunden, in England erwiesen sich jedoch ca. 11 % der aus Geflügel und 20 % der aus Menschen isolierten Stämme als resistent. In Deutschland liegen die entsprechenden Werte mit ca. 40 % bei Geflügel und beim Menschen relativ hoch (STROH, 2002).

2.1.6 *Pharmakokinetik*

Die 4-Chinolone der 1. Generation sind gut resorbierbar, weisen jedoch ein starke Bindung an Plasmaproteine auf (Nalidixinsäure > 95 %) und werden schnell metabolisiert. Die daraus resultierenden kurzen Eliminationshalbwertszeiten von nur wenigen Stunden, führen dazu, dass nur in der Niere, dem Hauptausscheidungsorgan, ausreichende hohe Wirkstoffspiegel erreicht werden. Laut FREY und LÖSCHER (2002) besitzen die neueren Wirkstoffe der 4-Chinolone günstigere pharmakokinetische Eigenschaften. Sie werden nach oraler und parenteraler Applikation schnell und gut resorbiert. Die Plasmaproteinbindung beträgt 10-20 %, in Einzelfällen bis zu 40 %, so dass die Plasmaspiegel im therapeutischen Bereich liegen. 4-Chinolone sind gut gewebebegängig, die Gewebkonzentration in Lunge, Bronchialschleimhaut, Knochen, Leber und Haut können das 3-4-fache der Blutplasmaspiegel erreichen (SÖRGEL et al., 1996). So wird zum Beispiel nach einer einmaligen Gabe von 2,5 mg/kg Marbofloxacin beim Hund nach 1-4 Stunden eine Konzentration von 5,8 µg/ml in der Leber erreicht, die Serumwerte liegen dagegen bei 0,9 µg/ml. Die höchsten Konzentrationen sind jedoch im Urin mit 25 µg/ml und in der Galle mit 30 µg/ml zu finden (SCHNEIDER et al., 1996).

Unter den Chinolonen finden sich Substanzen mit starker, geringerer und nur ganz schwacher Metabolisierung. Dementsprechend unterscheiden sich auch die Anteile an unveränderter Substanz und ausgeschiedenen Metaboliten (SÖRGEL, 1989). Enrofloxacin wird beispielsweise zu 40% in der Leber zu Ciprofloxacin deethyliert, das dann nur mehr zu einem geringen Anteil metabolisiert wird. Danofloxacin wird zu einem N-Desmethylmetabolit verstoffwechselt und Marbofloxacin wird in der Leber zu N-Desmethylmarbofloxacin und N-Oxidmarbofloxacin, zwei inaktiven Metaboliten, umgewandelt (LEFEBVRE et al., 1998).

Für die meisten Chinolone ist die Ausscheidung über die Nieren der Haupteliminationsweg (üblicherweise > 50 %). Die Elimination erfolgt dort durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion. Der Rest wird biliär sezerniert und über den Faeces ausgeschieden (LÖSCHER et al., 2002). Bei neueren Chinolonen (Moxifloxacin, Trovafloxacin) kommt es auf Grund einer höheren Lipophilie zu tubulärer Rückresorption. So findet hier die Elimination überwiegend biliär statt (SÖRGEL et al., 2002).

2.1.7 Unerwünschte Wirkungen

Grundsätzlich werden nach STAHLMANN (1999) bei allen 4-Chinolonen Nebenwirkungen (1 - 7 %) wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö beobachtet, die zwar bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen kontraproduktiv, jedoch nach Absetzen des 4-Chinolons reversibel sind. Dies gilt auch für die ZNS-Reaktionen (gesamt 1 - 5 %), die auf der Interaktion mit den GABA-Rezeptoren beruhen (eine Hemmung der Bindung von γ -Aminobuttersäure an den GABA-Chlorid-Kanal-Rezeptorkomplex wird angenommen) und sich als Schlaflosigkeit, Benommenheit oder Kopfschmerz äußern. Bei älteren Patienten sowie prädisponierten Personen werden selten psychotische Reaktionen wie Halluzinationen, Depression oder Krampfanfälle beobachtet. 4-Chinolone und die davon abgeleiteten Metaboliten sind zumeist schlecht wasserlöslich, so dass sie zu interstitiellen Nephritiden durch Kristallurie führen können. In seltenen Fällen kann es zu Thrombozytopenien, Leukopenien und Anämien kommen. Die ebenfalls sehr seltenen Arthropathien werden wahrscheinlich durch eine Chelatbildung der β -Ketocarbonsäure mit Mg^{2+} im Knorpelgewebe hervorgerufen. Bei 4-Chinolonen, die in 8-Position ein zusätzliches Halogenatom (F oder Cl) aufweisen, kann es zu Phototoxizität kommen (CHRIST, 1998). Interaktionen mit Kationen und Theophyllin wurden von BOWLES et al. (1988) und BEM und MANN (1988) beschrieben. Das β -Ketocarbonsäure-Strukturelement der 4-Chinolone komplexiert ausgezeichnet divalente und trivalente Kationen wie Mg^{2+} und Al^{3+} , die in Antazida enthalten sind. Es bilden sich unlösliche Komplexe, die nicht mehr resorbiert werden können. Daher muss dringend eine Latenzzeit von mindestens vier Stunden zwischen Antazida- und 4-Chinoloneinnahme eingehalten werden. Auch sollen Gyrasehemmstoffe nicht mit Milch eingenommen werden. Ebenso beeinflussen eisenhaltige Vitamin-Kombinationspräparate die Resorption negativ. Die

Interaktion mit Theophyllin beruht auf der Hemmung des Cytochrom-P450-abhängigen Metabolismus der Xanthine durch die 4-Chinolone (FUHR et al., 1992).

2.2 Rückstände von Fluorchinolonen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Die Grundlage der lebensmittelrechtlichen Beurteilung von Stoffen mit pharmakologischer Wirkung liegt in § 10 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuchs (LFGB). Danach dürfen Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft festgesetzte Höchstmengen nicht überschreiten. In 12

Tabelle 2 sind die festgesetzten Höchstmengen für Chinolone nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90, Anhang I aufgeführt.

Fluorchinolone sind in Deutschland seit 1983 (Baytril®) für den Einsatz in der Veterinärmedizin zugelassen. Seitdem wurden weitere Fluorchinolone wie Danofloxacin (Advocid®), Marbofloxacin (Marbocyl®), Difloxacin (Dicural®), Oxolinsäure (Inoxyl®) auf dem deutschen Markt eingeführt und finden in der antibakteriellen Therapie bei Rind, Schwein und Geflügel oder bei in Aquakulturen gehaltenen Tieren breite Anwendung.

Im Jahre 2004 wurden bei 30 Proben, die im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplanes untersucht wurden, Rückstände antimikrobiell wirksamer Stoffe nachgewiesen. Von den insgesamt untersuchten 12630 Proben wurden 2991 Proben auf Chinolone untersucht, dabei erwiesen sich drei Proben als positiv (Nationaler Rückstandskontrollplan 2004). In der Schweiz wurden 2002 im Rahmen einer Kampagne der Kantone Basel-Landschaft und Basel-Stadt Geflügelfleischproben auf Tierarzneimittel-Rückstände untersucht. Von den 34 untersuchten Proben enthielten 20 Proben Enrofloxacin-Rückstände. Außerdem konnten bei elf Proben Ciprofloxacin, bei vier Proben Sarafloxacin und bei drei Proben Danofloxacin nachgewiesen werden (Kantonales Laboratorium Basel-Stadt, Auszug aus dem Jahresbericht 2002).

Tabelle 2: Höchstmengen für Chinolone (MRLs) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, festgesetzt durch die Verordnung (EWG) Nr. 2377/90

Pharmakologisch wirksamer Stoff	Marker-Rückstand	Tierspezies	MRL (µg/kg)				
			Muskel	Fett	Leber	Niere	Milch
Dan	Dan	Rinder, Schafe, Ziegen	200	100	400	400	30
		Geflügel	200	100 ¹	400	400	-
		Alle anderen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tierarten.	100	50	200	200	-
Dif	Dif	Rinder, Schafe, Ziegen	400	100	1400	800	-
		Schweine	400	100	800	800	-
		Geflügel	300	400 ¹	1900	600	-
		Alle anderen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tierarten.	300	100	800	600	-
Enr	Enr+Cip	Rinder, Schafe, Ziegen	100	100	300	200	100
		Schweine, Kaninchen	100	100	200	300	-
		Geflügel	100	100 ¹	200	300	-
		Alle anderen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tierarten.	100	100	200	200	-
Flu	Flu	Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen	200	300	500	1500	50
		Geflügel ³	400	250	800	1000	-
		Fisch	600 ²	-	-	-	-
		Alle anderen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tierarten ³	200	250	500	100	-
Mar	Mar	Rinder	150	50	150	150	75
		Schweine	150	50 ¹	150	150	-
Oxo	Oxo	Rinder ⁴	100	50	150	150	⁴
		Schweine, Hühner ³	100	50 ¹	150	150	-
		Fisch	100 ²	-	-	-	-
Sar	Sar	Hühner	-	10 ¹	100	-	-
		Salmoniden	30 ²	-	-	-	-

Erläuterungen zur Tabelle auf der nächsten Seite.

Erläuterungen zur 12

Tabelle 2:

¹ Fett + Haut;

² Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen;

³ Nicht anwenden bei Tieren, von denen Eier für den menschlichen Verzehr gewonnen werden.

⁴ Nicht anwenden bei Tieren von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird.

Cip = Ciprofloxacin

Dan = Danofloxacin

Dif = Difloxacin

Enr = Enrofloxacin

Flu = Flumequin

Mar = Marbofloxacin

Oxo = Oxolinsäure

Sar = Sarafloxacin

Bei einer 1995 durchgeführten Untersuchung der Asian Development Bank und der NACA (Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific) von 11000 Aquakultur-Betrieben wurde in intensiven Shrimp-Farmen eine erhöhte Frequenz der Antibiotika-Nutzung festgestellt (DALSGAARD et al., 1995). Im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika eignen sich 4-Chinolone wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit und ihres breiten Wirkspektrums besonders gut zum Einsatz in Aquakulturen (LUNESTAD et al., 1991). So stellen laut HOLMSTRÖM et al. (2003) Norfloxacin, Oxytetracyclin, Enrofloxacin und verschiedene Sulfonamide die am häufigsten in Aquakulturen eingesetzten Antibiotika dar.

SAITANU et al. (1994) berichteten, dass 8,4 % von 1461 Garnelen-Proben, die zwischen Oktober 1990 und 1991 auf dem thailändischen Markt gekauft wurden, positiv auf Oxytetracycline und Oxolinsäure getestet wurden. Auch in gefrorenen Shrimps aus Lateinamerika wurden Rückstände wie Oxolinsäure entdeckt (BROWN und HIGUERA-CIAPARA, 1992). Nicht nur in der Shrimp-Zucht auch in der Fisch-Zucht werden Chinolone eingesetzt. Aus einem Teilbericht zur nationalen Untersuchung von Salmoniden auf Tierarzneimittel-Rückstände, geht hervor, dass in sechs von 65 untersuchten Proben

Flumequin nachgewiesen wurde (Kantonales Labor Basel-Landschaft, Auszug aus dem Jahresbericht 2001).

14

2.3 Nachweisverfahren

Zum Nachweis von 4-Chinolonen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurden verschiedene mikrobiologische, chemisch-physikalische und immunologische Nachweisverfahren beschrieben. Im Folgenden wird ein Überblick über die momentan zur Verfügung stehenden Nachweismethoden gegeben.

2.3.1 Mikrobiologische Nachweisverfahren

Das Prinzip mikrobiologischer Nachweisverfahren beruht darauf, dass das Wachstum und die Stoffwechselaktivität empfindlicher, meist schnell wachsender Mikroorganismen gehemmt wird. Obwohl die für den mikrobiologischen Nachweis verwendeten Mikroorganismen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen aufweisen, liegt der Nachteil dieser Verfahren darin, dass keine unmittelbare Unterscheidung zwischen Tierarzneimittelrückständen und anderen Hemmstoffen möglich ist (MEYER-BURGMAYER, 1980; CARLSSON und BJÖRCK, 1987).

Bei den verschiedenen Agar-Diffusionsverfahren werden Hemmstoffe durch Messen des Hemmhofdurchmessers oder des Farbumschlages zugesetzter Indikatoren nachgewiesen. Für den empfindlichen Nachweis von Chinolonen haben sich nach SUHREN (1997) folgende Mikroorganismen als geeignet erwiesen: *Escherichia coli* (ATCC 25922, ATCC 27166 und ATCC 11303), *Vibrio anguillarum* und *Yersinia ruckeri*.

Ein von SUHREN et al. (1996) beschriebener Agar-Diffusionstest im Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von Ciprofloxacin und Enrofloxacin in Milch basiert auf der Verwendung von *E. coli* ATCC 11303 als Testmikroorganismus. Außerdem wird als pH-Indikator Neutralrot zugegeben und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 9,5 eingestellt. Die zu untersuchende Probe wird nach Erhitzen (10 min bei 80° C) auf die Mikrotiterplatte verbracht. Beim Bebrüten (37° C; 18 - 24 h) vermehren sich die Mikroorganismen und bewirken einen

Farbumschlag des Indikators von gelb-orange nach rot. Wird das Wachstum des Testkeimes durch in der Probe vorhandene Chinolone oder andere Hemmstoffe verhindert, behält das

15

Medium seine ursprüngliche Farbe. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 2 und 5 µg/l für Enrofloxacin bzw. Ciprofloxacin.

Ein verbesserter mikrobiologischer Nachweis wird von KÜHNE (1999) beschrieben. Er verwendet als Testorganismus *E. coli*, Stamm 14 (Bayer AG) und setzt dem Nährboden (Standard II von Merck) zur Empfindlichkeitssteigerung zusätzlich noch Trimethoprim (0,05 µg/kg) zu. Die Nachweisgrenzen des Agardiffusionstest für Enrofloxacin und Ciprofloxacin liegen bei 2- 2,5 µg/l.

SCHNEIDER und DONOGHUE (2004) beschreiben einen Bioassay zum Nachweis von Enrofloxacin. Der hierfür verwendete Mikroorganismus, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), wird in Müller Hinton Agar verbracht und auf Petrischalen ausgegossen. Je 200 µl der zu untersuchenden Proben und Standardkonzentrationen von Enrofloxacin werden in ausgestanzte Löcher auf den Agar gefüllt. Nach einer Bebrütung über 16 Stunden bei 37° C kann anhand des Hemmhofes das Ergebnis bestimmt werden. Der Test ist mit einer Nachweisgrenze von 26 µg/l für Enrofloxacin jedoch nicht besonders empfindlich.

2.3.2 Chemisch-physikalische Nachweisverfahren

2.3.2.1 Chromatographische Nachweisverfahren

An chromatographischen Verfahren werden zum Nachweis von Chinolonen die Dünnschichtchromatographie (DC), die Flüssigkeitschromatographie (LC) und die Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektroskopie (GC-MS) verwendet. Bei den LC-Verfahren wurde früher die Ultraviolett-Absorption als Detektionsmethode eingesetzt (IKAI et al., 1989; HORIE et al., 1991), heutige Systeme benutzen die sensitivere und selektivere Fluoreszenzdetektion. Eine Übersicht über einige chromatographische Nachweisverfahren geben Tabelle 4 bis 17

Tabelle 5. Eine ausführliche Zusammenfassung, insbesondere zu chromatographischen Nachweisverfahren, ist bei HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al. (2002) zu finden.

Tabelle 3: Dünnschichtchromatographische Verfahren zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika

Probenmaterial	Nachweis von	Extraktion	Fließmittel	Nachweisgrenze	Referenz
Muskel (Fisch)	Flu	Tetrachlormethan	Tetrahydrofuran/Dichlormethan/ Aceton/Essigsäure	1 ng/ml	TAO et al. (1989)
Muskel (Fisch)	Flu, Oxo	Acetonitril/H ₂ O	Toluol-Ethylacetat/Armeisensäure	8 - 9 ng/ml	VEGA et al. (1995)
Muskel (Schwein)	Cip, Dan, Enr, Flu, Nal, Nor, Oxo	Acetonitril/H ₂ O	Methanol/Ammoniak	5 - 15 ng/ml	JUHEL-GAUGIN et al. (1998)

Tabelle 4: Gaschromatographische Verfahren zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika

Probenmaterial	Nachweis von	Extraktion	Derivatisierung	Nachweisgrenze	Referenz
Muskel (Fisch)	Oxo	Ethylacetat	NaBH ₄	1 ng/ml	TAKATSUKI (1991)
Muskel (Fisch)	Oxo, Pir	Aceton	NaBH ₄	k. A.	PFENNING et al. (1996)
Shrimp, Fisch	Flu, Nal, Oxo, Pir	Aceton	NaBH ₄	10 ng/ml	MUNNS et al. (1998)

k.A. = keine Angaben, Cip = Ciprofloxacin, Dan = Danofloxacin, Dif = Difloxacin, Enr = Enrofloxacin, Flu = Flumequin, Mar = Marbofloxacin, Nal = Nalidixinsäure, Nor = Norfloxacin, Oxo = Oxolinsäure, Pir = Piromidsäure, Sar = Sarafloxacin

Tabelle 5: Hochdruckflüssigkeitschromatographische Verfahren zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika

Probenmaterial	Nachweis von	Extraktion	Mobile Phase	Nachweisgrenze	Referenz
Fett, Leber, Niere, Haut, Muskel (Huhn)	Cip, Enr	Dichlormethan	Methanol/ 0,01 M Phosphorsäure (30/70)	3 ng/ml	ANADON et al. (1995)
Shrimps, Muskel (Fisch)	Flu, Nal, Oxo, Pir	Aceton	Acetonitril/Tetrahydrofuran/ 0,02 M Phosphorsäure (16/12/72)	5 ng/ml	MUNNS et al. (1995)
Shrimps	Oxo	Ethylacetat	Acetonitril/ 0,1 M H ₃ PO ₄ (35/65)	3,5 ng/ml	SAITANU et al. (1996)
Milch	Cip, Enr, Sar	Ethanol	Acetonitril/H ₂ O (k. A.)	1 - 1,5 ng/ml	SUHREN et al. (1996)
Eier	Cip, Enr	Acetonitril	Acetonitril/Triethylamin/H ₂ O (19/1/80)	Enr: 19 ng/ml Cip: 156 ng/ml	GORLA et al. (1997)
Shrimps/Fischmuskel Milch	Flu, Nal, Oxo, Pir	Aceton	Acetonitril/H ₂ O (2/98)	1 ng/ml	VOLMER et al. (1997)
Muskel (Huhn, Fisch, Schwein)	Cip, Dan, Dif, Enr, Mar, Nor, Sar	Dichlormethan	Acetonitril/0,01 M Oxalsäure (89/11)	k. A.	HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al. (2000)
Leber, Muskel (Fisch)	Cip, Enr	Ethanol	Acetonitril/Phosphatpuffer (15/85)	k. A.	INTORRE et al. (2000)
Muskel (Huhn)	Cip, Enr	Acetonitril	Acetonitril/H ₂ O (17/83)	1 ng/ml	PALMADA et al. (2000)
Leber, Niere, Haut (Fisch)	Flu	Methanol	Acetonitril/Essigsäure/H ₂ O (50/2/48)	k. A.	PLAKAS et al. (2000)
Milch	Cip, Dif, Enr, Sar	Essigsäure	Acetonitril/H ₂ O (15/85)	0,25 - 0,83 ng/ml	HOLTZAPPLE et al. (2001)
Leber, Eier (Huhn)	Cip, Dan, Enr, Nor, Sar	Acetonitril/ NH ₄ OH	Acetonitril/ Triethylamin	Cip, Enr, Nor, Sar, 1 - 3 ng/ml	SCHNEIDER und DONOGHUE (2004)

^averwendete Festphase: ¹ RP- 18 Säule, ² RP-8 Säule, ³ RP-Polymer, ⁴ phenyl modifiziertes RP Materia

2.3.3 *Immunologische Nachweisverfahren*

Immunologische Verfahren beruhen auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Die dabei entstandenen Komplexe werden in den verschiedenen Formaten von immunologischen Testsystemen durch markierte Reagenzien sichtbar gemacht. Als Marker werden radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) sowie lumineszierende oder fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay, FIA) eingesetzt. Dabei können je nach Testanordnung Antikörper oder Antigene nachgewiesen werden (EDWARDS et al., 1982; MÄRTLBAUER, 1993).

Die enzymimmunologischen Verfahren können in kompetitive und nicht kompetitive Systeme eingeteilt werden (EKINS, 1985). Beim kompetitiven Verfahren konkurrieren markiertes und unmarkiertes Antigen um eine definierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Niedermolekulare Substanzen wie die Chinolone, die nur eine Antikörperbindungsstelle besitzen, können nur mit kompetitiven Testsystemen nachgewiesen werden. Kompetitive Verfahren können weiter unterteilt werden in simultane oder konsekutive Testanordnungen, je nachdem, ob markiertes und nichtmarkiertes Antigen gleichzeitig mit dem Antiserum inkubiert werden oder ob die Inkubation nacheinander und durch die Waschschriffe getrennt erfolgt.

Innerhalb der kompetitiven Verfahren können außerdem direkte und indirekte Verfahren unterschieden werden (MÄRTLBAUER, 1993). Beim direkten Verfahren ist eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörper entweder unmittelbar oder über einen zweiten Anti-Ig-Antikörper (Double Antibody Solid Phase, DASP; Doppelantikörpertechnik) an ein Trägermaterial gebunden. Um diese Antikörperbindungsstellen konkurrieren freies und enzymgebundenes Antigen. Nach ausreichender Inkubationszeit werden ungebundene Reagenzien durch einen Waschschriffe entfernt. Danach wird ein Enzym-spezifisches Substrat zugegeben, der durch das gebundene Enzymkonjugat katalysierte Substratumsatz ist dabei umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen.

Beim indirekten Verfahren dient ein Antigen-Protein-Konjugat als Festkörperphase und konkurriert mit dem in der Probe vorhandenen freien Antigen um die Bindungsstellen von

spezifischen Antikörpern. Die Anzahl der an die Festkörperphase gebundenen Antikörper wird indirekt durch Zugabe eines enzymmarkierten, tierartspezifischen Sekundärantikörpers bestimmt (MÄRTLBAUER, 1988).

Bei allen enzymimmunologischen Verfahren sind homologe und heterologe Kombinationen von Antiserum und Enzymkonjugat zu unterscheiden. Von homologen Kombinationen spricht man bei einer identischen antigenen Determinante an Immunogen und Enzymkonjugat. Wird dagegen zur Herstellung des Enzymkonjugates ein anderes Hapten (heterologes Hapten), ein anderes Kopplungsreagenz (heterologe Brücke), oder eine andere Kopplungsstelle am Molekül (heterologe Seite) als zur Herstellung des Immunogens verwendet, spricht man von heterologen Kombinationen.

2.3.3.1 Enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Fluorchinolonen

Einen Überblick über wichtige Kenndaten von bislang beschriebenen Enzymimmuntests zum Nachweis von Chinolon-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs gibt 21

Tabelle 6. Zur Kopplung der als Immunogene verwendeten Fluorchinolone an die Trägerproteine wurden bislang ausnahmslos die aktive Ester- bzw. Carbodiimid- Methode eingesetzt. In der Regel konnten so hoch affine Antikörper gewonnen werden, die Nachweisgrenzen der Enzymimmuntests lagen meist im Bereich von 0,5 – 2 ng/ml.

Mit den so gewonnenen Antikörpern konnten jedoch meist nur einige wenige Vertreter der Fluorchinolone nachgewiesen werden. So reagierten Antikörper gegen Enrofloxacin meist nur noch mit Ciprofloxacin (HAMMER und HEESCHEN, 1995), die gegen Sarafloxacin gerichteten Antikörper zeigten nennenswerte Kreuzreaktionen nur mit den strukturell verwandten Difloxacin und Trovafloxacin (HOLTZAPPLE et al., 1997). Zur Herstellung all dieser Antikörper wurden Immunogene verwendet, bei denen die Chinolone über die Carboxylgruppe an die Trägerproteine gekoppelt worden waren.

Im Hinblick auf die Rückstandshöchstmengen nach Verordnung (EWG) 2377/90 wäre jedoch die Erstellung von gruppenspezifischen Tests sinnvoll. In der Literatur wurden bislang nur einige Immuntests mit begrenzter Gruppenspezifität für Chinolone beschrieben, da die Gewinnung geeigneter Antikörper auf Grund der hohen strukturellen Heterogenität dieser Substanzgruppe Schwierigkeiten bereitet. Durch die Kopplung von Norfloxacin über den Piperazinring an Trägerproteine gelang es BUCKNALL et al. (2003) bzw. VERHEIJEN et al. (2003) gruppenspezifische Antikörper zu gewinnen, die mit zehn verschiedenen Chinolonen reagierten. Jedoch erfassen beide EIAs die für diese Gruppe wichtigen mit MRLs belegten Chinolone nicht ausreichend. Die von beschreiben VERHEIJEN et al. (2003) beschriebenen Antikörper zeigten Kreuzreaktionen von über 50 % mit vier Chinolonen (Enoxacin, Enrofloxacin, Fleroxacin und Pefloxacin), mit MRL belegte Chinolone wie Sarafloxacin, Difloxacin wurden hingegen nicht erfasst. BUCKNALL et al. (2003) erfassen mit ihrem Test auch mehrere Chinolone, hohe Kreuzreaktionen traten insbesondere mit Enoxacin (143 %) und Oxolinsäure (40 %) auf.

Die entwickelten EIAs wurden zur Untersuchung von Probenmaterialien, wie Milch, Leber, Muskel, Niere, Eier und Shrimps verwendet. Die dazu notwendige Probenaufbereitung hängt stark von dem zu untersuchenden Material bzw. Testsystemen ab. So konnten COILLIE et al. (2004) verdünnte Rohmilch ohne weitere Aufarbeitung in den EIA einsetzen, bei WATANABE et al. (2002) mussten die Milchproben entfettet und anschließend mit Methanol extrahiert werden. HAMMER und HESCHEN (1995) behandelten die Milchproben mit 4% Oxalsäure. Feste Probenmatrices wurden in der Regel mit Ethanol, Methanol bzw. Aceton extrahiert und Verdünnungen der so gewonnenen Extrakte anschließend in den EIA eingesetzt.

Tabelle 6: Enzymimmunologische Nachweisverfahren für Chinolone

Nachweisbare Chinolone	Immunogen	Immunisierte Tiere	Proteinkonjugat	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze	Referenz
Cip, Enr	Enr-BSA ¹	Kaninchen	k. A. ³	indirekt	1,56 ng/ml	HAMMER und HEESCHEN (1995)
Sar, Dif, Tro	Sar-BSA ¹	Maus	Sar-cOVA ¹	indirekt	2 ng/ml	HOLTZAPPLE et al. (1997)
Cip, Enr, Nor	Cip-BSA ¹	Kaninchen	Cip-HSA ¹	indirekt	0,32 ng/ml	DUAN und YUAN (2001)
Enr	Enr-HSA ¹	Maus	Enr-HRP ¹	direkt	10 ng/g Leber, Muskel 1 ng/ml Milch	WATANABE et al. (2002)
Nor, Eno, Oxo, Pip, OfI, Nal, Cip, Enr, Flu	Nor-OVA ²	Schaf	Nor-HRP ²	direkt	k. A.	BUCKNALL et al. (2003)
Nor, Nad, Enr, Cip, Pef, Fle, Dan, Lom, Eno, OfI, Oxo,	Nor-BTG ²	Kaninchen	Nor-HRP ²	direkt	0,1 – 1,4 ng/ml Eier, Milch, Shrimp	VERHEIJEN et al. (2003)
Flu	Flu-cBSA ¹	Huhn	Flu-cOVA ²	indirekt	50 ng/ml	COILLIE et al. (2004)

Erläuterungen zur Tabelle siehe nächste Seite.

Erklärungen zu 21

Tabelle 6:

¹ Gekoppelt über die aktive Estermethode

² Gekoppelt über die Carbodiimid-Methode

³ Enrofloxacin wurde direkt an die Mikrotiterplatten immobilisiert

Cip = Ciprofloxacin	Dan = Danofloxacin	Dif = Difloxacin	Eno = Enoxacin
Enr = Enrofloxacin	Fle = Fleroxacin	Flu = Flumequin	Lom = Lomefloxacin
Nad = Nadifloxacin	Nal = Nalidixinsäure	Nor = Norfloxacin	Ofl = Ofloxacin
Oxo = Oxolinsäure	Pef = Pefloxacin	Pip = Pipemidsäure	Sar = Sarafloxacin
Tro = Trovafloxacin			

BSA = Bovines Serumalbumin

HSA = Humanes Serumalbumin

BTG = Bovines Thyroglobulin

OVA = Ovalbumin

2.3.4 *Alternative Testformate*

STERNESJÖ et al. (1996) beschreiben den Nachweis von Enrofloxacin und seinem Metabolit Ciprofloxacin mit Hilfe eines Biosensors. Dieser Biosensor basiert auf einer „Biospezifischen Interaktionsanalyse“ (BIA). Solche Systeme nutzen die Oberflächen-Plasmon-Resonanz zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. Dabei wird dem an einem Sensor-Chip immobilisierten Molekül der zu testende Reaktionspartner mittels eines Fließinjektionssystems zugeführt. Die Nachweisgrenze liegt bei 2 ng/ml. STERNESJÖ et al. (1996) untersuchten mit diesem Verfahren Milch von klinisch erkrankten Tieren die mit Baytril® behandelt wurden.

Das Charm ROSA („rapid one step assay“) Testsystem stellt ein Schnelltest dar, mit dem man neben verschiedenen Antibiotika auch Enrofloxacin nachweisen kann (CHARM SCIENCES INC.). Dabei handelt es sich um einen indirekt kompetitiven Enzymimmunttest, der in Form von Streifen erhältlich („Strip-ELISA“) und in einem einzigen Arbeitsschritt ausführbar ist („Ein-Schritt-Test“). Die Durchführung wird von QUANDT (2005) beschrieben. Der Charm ROSA Test ist sowohl visuell als auch instrumentell auswertbar,

wobei die instrumentelle Auswertung jedoch empfohlen wird (REYBROECK und OOGHE, 2002). Die Nachweisgrenze liegt bei 10 ng/ml.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton	(Riedel-de Haen, 32201)
Bovines Serumalbumin	(Sigma Chemie GmbH, B-2518)
Casein (Natriumsalz)	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
N',N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	(Sigma Chemie GmbH, D-3218)
Ethanol 96 %	(Riedel-de Haen, 24105)
Glukoseoxidase (GlcOx)	(Sigma Chemie GmbH, G-2133)
Glutaraldehyd	(Sigma Chemie GmbH, G-6275)
Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	(Merk Calbiochem GmbH, 374805)
Laktose Monohydrat	(Merck Eurolab GmbH, 107657)
Magermilchpulver	(Oxoid Unipath GmbH, L31)
Meerrettichperoxidase (HRP)	(Sigma Chemie GmbH, P-8375)
Methanol	(Fluka Chemie GmbH, 65543)
Natriumborhydrid	(Sigma Chemie GmbH, S-9125)
Neutralrot	(Sigma Chemie GmbH, N-4638)
Ovalbumin Grade II (OVA)	(Sigma Chemie GmbH, A-2553)
Ovalbumin Grade I, 99%	(Sigma Chemie GmbH, A-2512)
Standard II Nähragar	(Merck Eurolab GmbH, 108681)
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma Chemie GmbH, P-1379)

Alle weiteren, nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck in p. a. Qualität bezogen.

3.1.2 Chinolone

Ciprofloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 03565c)
Ciprofloxacin-Ethylendiamin	(USP Tm, 13432)

Clinafloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 03508c)
Clioquinol	(Fluka Chemie GmbH, 24880)
Danofloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 00900d)
Enoxacin	(Sigma Chemie GmbH, E-3764)
Enrofloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 01088e)
Flumequin	(Sigma Chemie GmbH, F-7016)
Ibafloxacin (Ibafin®)	(Intervet, 3w006)
Levofloxacin	(Fluka Chemie GmbH, 28266)
Lomefloxacin	(Sigma Chemie GmbH, L-2906)
Marbofloxacin	(Vetoquinol, 50210)
Nalidixinsäure	(Sigma Chemie GmbH, N-8878)
Norfloxacin	(Sigma Chemie GmbH, N-9890)
Ofloxacin	(Sigma Chemie GmbH, O-8757)
Oxolinsäure	(Sigma Chemie GmbH, O-0877)
Pazufloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 010775p)
Sarafloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 01073s)
Sparfloxacin	(Fluka Chemie GmbH, 56968)
Tosufloxacin	(Sequoia Research Products Ltd., 02535t)

Zur Herstellung der Chinolon-Standard-Stammlösungen (1 mg/ml) wurden jeweils 2-4 mg eines Fluorchinolons in eine braune 5 ml-Glasflasche eingewogen und unter Berücksichtigung des Salzanteils durch Zugabe des entsprechenden Volumens Methanol gelöst. Um die Löslichkeit bei einigen Chinolonen zu verbessern, wurde bei diesen Chemotherapeutika pro ml Methanol ca. 20 µl NaOH (1 mol/l) zugegeben. Aus diesen Stammlösungen wurden bei Bedarf Verdünnungsreihen in PBS, 8 % Methanol/PBS oder Magermilchlösung zur Herstellung von Standardkurven angelegt.

3.1.3 Puffer und Lösungen

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

2 % (g/V) Casein-PBS-Lösung

2 % (g/V) Ovalbumin-PBS-Lösung

0,21 mol/l Citratpuffer mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂ (pH 3,9)

1 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,4)

0,1 mol/l Bicarbonat-Puffer (pH 8,5)

0,9 % Natriumchloridlösung

0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (PBS; pH 7,3)

0,05 mol/l Tris-Puffer (pH 7,5)

1 mol/l Schwefelsäure

Tetramethylbenzidinlösung (1 mmol 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol)

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween)

Substratlösung für Meerrettichperoxidase nach GALLATI und PRACHT (1985): 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und ein Teil Tetramethylbenzidinlösung

3.1.4 Immunreagenzien

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettichperoxidase (DAKO A/S. P 0217)

Schaf-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Sigma Chemie GmbH, 32K9151)

3.1.5 Probenmaterial

Tank-Milchproben aus der Routinetätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V.

Hemmstoffpositive (Baytril®) Kuhmilch sowie Kamelmilch.

Garnelen aus Lebensmittelgeschäften in München und Umland.

3.1.6 Geräte

Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040

(Heidolph Instruments)

Zentrifuge

(Varifuge 3.0R, Haereus-Christ GmbH)

Photometer UV 1602

(Shimadzu)

ELISA-Reader Sunrise

(Tecan Deutschland GmbH)

Magnetrührgerät Arex	(VELP Scientifica)
Mixgerät	(Severin)
pH-Meter pH 526	(WTW, E163694)
Autoclav Varioklav®	(H+P Labortechnik GmbH)
Ultraturax PT 2100	(Polytron)
Vortex Genie-Rüttler	(Bender u. Hobein)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)

3.1.7 *Sonstige Materialien*

BRT-Hemmstofftest Mikrotiterplatten-Testsystem	(AiM, Analytik in Milch GmbH)
Mikrotiterplatten	(Immunoplate, Nunc GmbH, 363452)
Dialyseschläuche 6 mm Durchmesser	(Serva Elektrophoresis GmbH, 44139)
Petrischalen	(Waldeck GmbH & Co. KG)

3.2 Methodik und Ergebnisse

3.2.1 *Herstellung der Immunreagenzien*

Da Fluorchinolone aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes per se nicht immunogen wirken (Haptene), müssen sie an ein Trägerprotein ausreichender Größe gekoppelt werden. Zur Gewinnung von Antikörpern gegen eine möglichst breite Palette der nach EU-VO 2377/90 mit Höchstmengen belegten Chinolonen mußte daher zunächst ein Hapten-Proteinkonjugat synthetisiert werden. Hierfür wurde ein Ciprofloxacin-Derivat mittels Glutaraldehyd an KLH gekoppelt. Zur Überprüfung der Antikörpertiter sowie zur Entwicklung kompetitiver EIAs zum Nachweis von Chinolonen wurden des weiteren Hapten-Protein-Konjugate hergestellt, wobei verschiedene Kopplungsmethoden, Antigene und Trägerproteine zum Einsatz kamen.

Für die Durchführung direkter kompetitiver EIAs wurden enzymmarkierte Antigene hergestellt. Hierfür wurden verschiedene Fluorchinolone (Ciprofloxacin-Ethylendiamin, Ciprofloxacin und Clinafloxacin) an Meerrettichperoxidase gekoppelt.

Außerdem wurde für die Etablierung eines indirekten kompetitiven EIAs Ciprofloxacin-Ethylendiamin an Glukoseoxidase und Norfloxacin an Ovalbumin gekoppelt.

3.2.1.1 Glutardialdehydmethode

Glutardialdehyd ist ein homobifunktionelles Kopplungsreagenz, das mit seinen reaktiven Aldehydgruppen nach AVRAMEAS (1969) bevorzugt und irreversibel mit den freien ϵ -Aminogruppen des Lysins oder mit den α -Aminogruppen N-terminaler Aminosäuren reagiert. Konjugate, die mit Glutardialdehyd gekoppelt wurden, setzen sich aus sehr heterogenen Komplexen zusammen.

Zur Herstellung eines Immunogens wurde Ciprofloxacin-Ethylendiamin an KLH gekoppelt (siehe Abbildung 3). Hierzu wurden Ciprofloxacin-Ethylendiamin, Glutardialdehyd und KLH in einem molaren Verhältnis von 5000 : 5000 : 1 in PBS gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Kopplungsansatz zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen zwei Tage gegen PBS (3 x 5 l) dialysiert. Die eingesetzten Mengen an Ciprofloxacin-Ethylendiamin und KLH sind in Tabelle 7 aufgeführt.

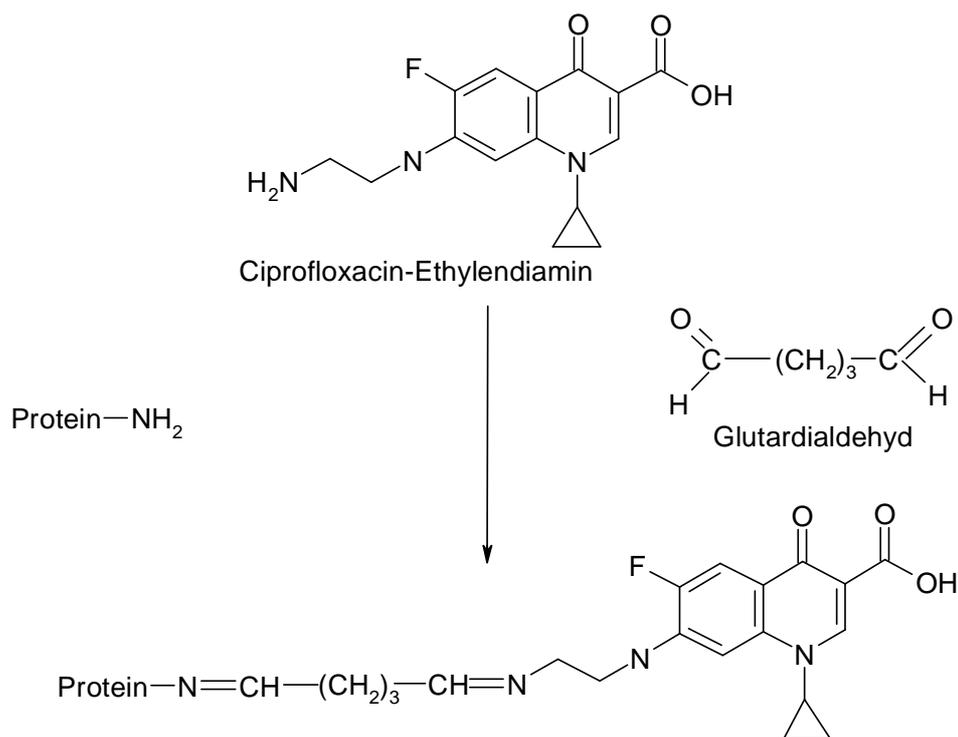


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Glutardialdehyd-Kopplungsmethode

3.2.1.2 Natriumperjodatmethode

Mit der zweistufigen Natriumperjodatmethode nach WILSON und NAKANE (1978) wurde Ciprofloxacin-Ethyldiamin an Meerrettichperoxidase und Glukoseoxidase, sowie Clinafloxacin an Meerrettichperoxidase gekoppelt.

Wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt, werden hierbei im ersten Schritt vicinale Hydroxylgruppen im Kohlenhydratanteil der Glykoproteine mittels Natriumperjodat oxidiert. Die dabei entstandenen Aldehydgruppen reagieren dann in einem zweiten Schritt mit der Aminogruppe des Reaktionspartners (Chinolone-Antibiotika) unter Ausbildung von Schiff'schen Basen. Diese werden durch anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid in stabile Amine überführt.

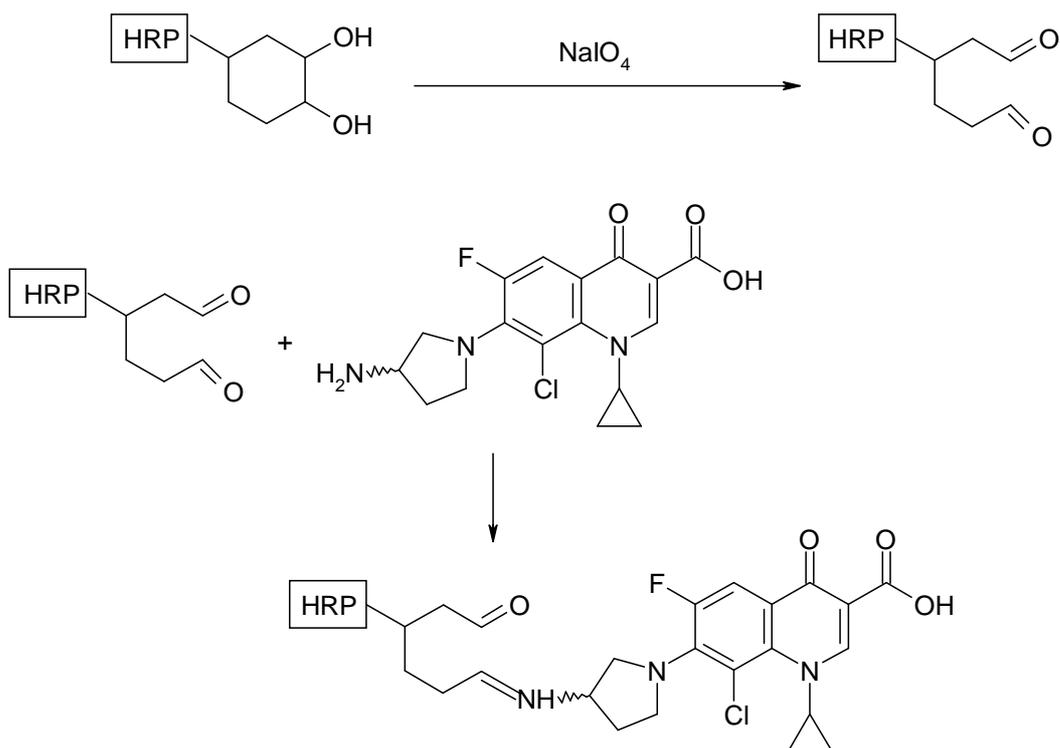


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Natriumperjodat-Kopplungsmethode

Für den ersten Schritt, die Oxidation der Glykoproteine mit Natriumperjodat, wurde eine wässrige Protein-Lösung mit einer 0,1 mol/l Natriumperjodatlösung versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zweimal gegen 1 mmol/l Natriumacetat-Puffer (pH 4,4; 5 l) dialysiert. Danach wurden Ciprofloxacin-Ethylendiamin bzw. Clinafloxacin in Bicarbonatpuffer gelöst (1 mg/ml) und zum Ansatz gegeben. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M Natronlauge in den basischen Bereich angehoben und mit einer 0,5 mol/l Bicarbonatpuffer-Lösung (pH 8,1) auf 9,5 eingestellt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zwei Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Reduktion der Schiff'schen Basen wurde nachfolgend Natriumborhydrid zugegeben und zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Kopplungsprodukt gegen PBS (pH 7,3) dialysiert (3 x 5 l). In Tabelle 7 sind die eingesetzten Mengen der Reagenzien und die Volumina der Lösungsmittel angegeben.

3.2.1.3 Carbodiimidmethode

Mit der Kopplungsmethode über wasserlösliches Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid, EDPC) wurden Ciprofloxacin an HRP und Norfloxacin an OVA gekoppelt. Im Reaktionsansatz lag das Verhältnis von HRP : Ciprofloxacin bei 1 : 100 bzw. von OVA : Norfloxacin bei 1 : 29.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, entsteht bei dieser einstufigen Reaktion an der Carboxylgruppe der Chinolone durch das im Überschuß zugegebene Carbodiimid ein O-Acylisoharnstoff, der mit den freien Aminogruppen des Proteins unter Bildung eines Amids und eines Harnstoffderivates reagiert (WONG, 1993). Für diesen Ansatz wurde Ciprofloxacin in Bicarbonatpuffer gelöst. Diese Lösung wurde dann mit HRP und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl-)Carbodiimid (jeweils in A. dest. gelöst) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Raumtemperatur wurde das Kopplungsprodukt gegen PBS (3 x 5 l) dialysiert. Die Mengen der verwendeten Reagenzien und der Lösungsmittel sind in Tabelle 7 angegeben.

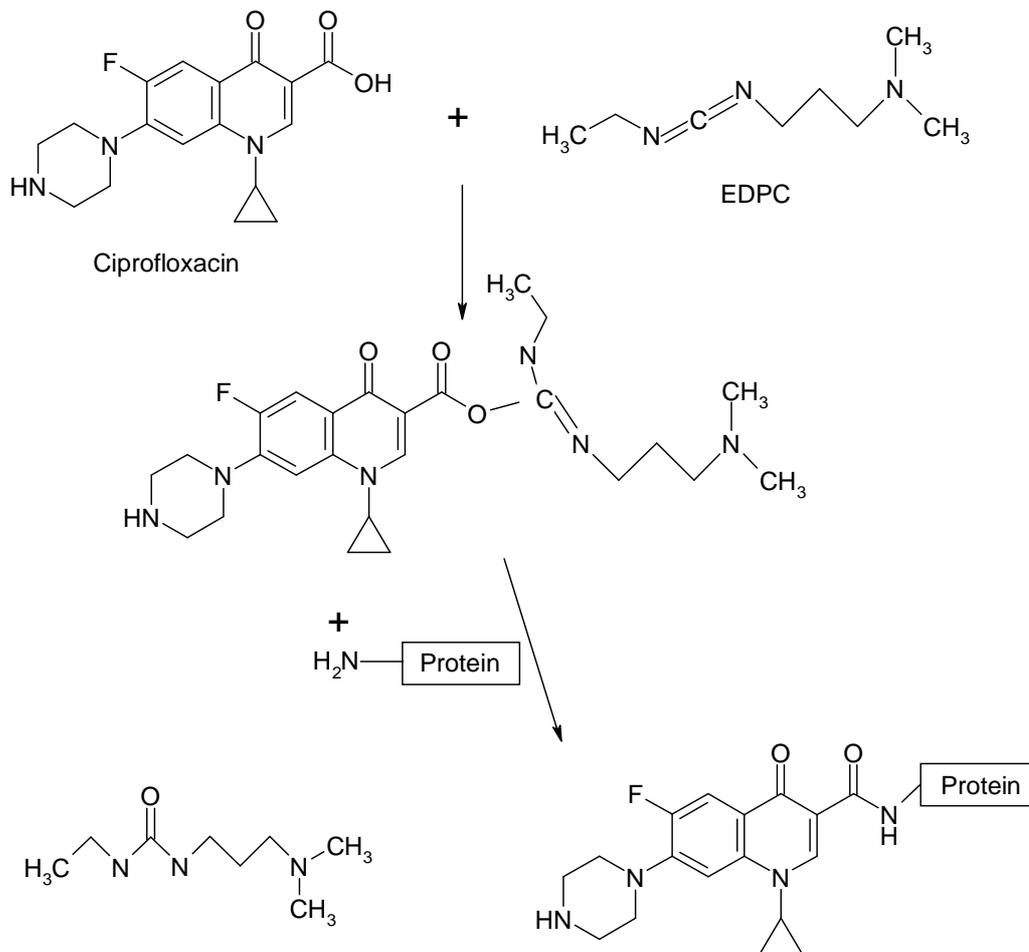


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Carbodiimid-Kopplungsmethode

3.2.1.4 Aktive Estermethode

Mit der aktiven Estermethode wurde Ciprofloxacin an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Die Kopplung über einen aktiven Ester läuft als zweistufige Reaktion ab. Im ersten Schritt entsteht im wasserfreien Medium durch Reaktion der Carboxylgruppe des Ciprofloxacins mit N-Hydroxysuccinimid unter Vermittlung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ein als aktiver Ester bezeichnetes Intermediärprodukt (siehe Abbildung 6). Im zweiten Schritt bindet sich im wässrigen Medium unter Spaltung des Esters das Ciprofloxacin kovalent an die freien Aminogruppen des Proteins (ANDERSON et al., 1964; KITAGAWA et al., 1981).

Zur Durchführung dieser Kopplungsmethode wurden Ciprofloxacin, N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in einem molaren Verhältnis von 1 : 5 : 10 in Dimethylformamid gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zur Meerrettichperoxidaselösung (in 0,13 mol/l NaHCO₃) gegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz zwei Tage gegen PBS (3 x 5 l) dialysiert. Die verwendeten Mengen der jeweiligen Substanzen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

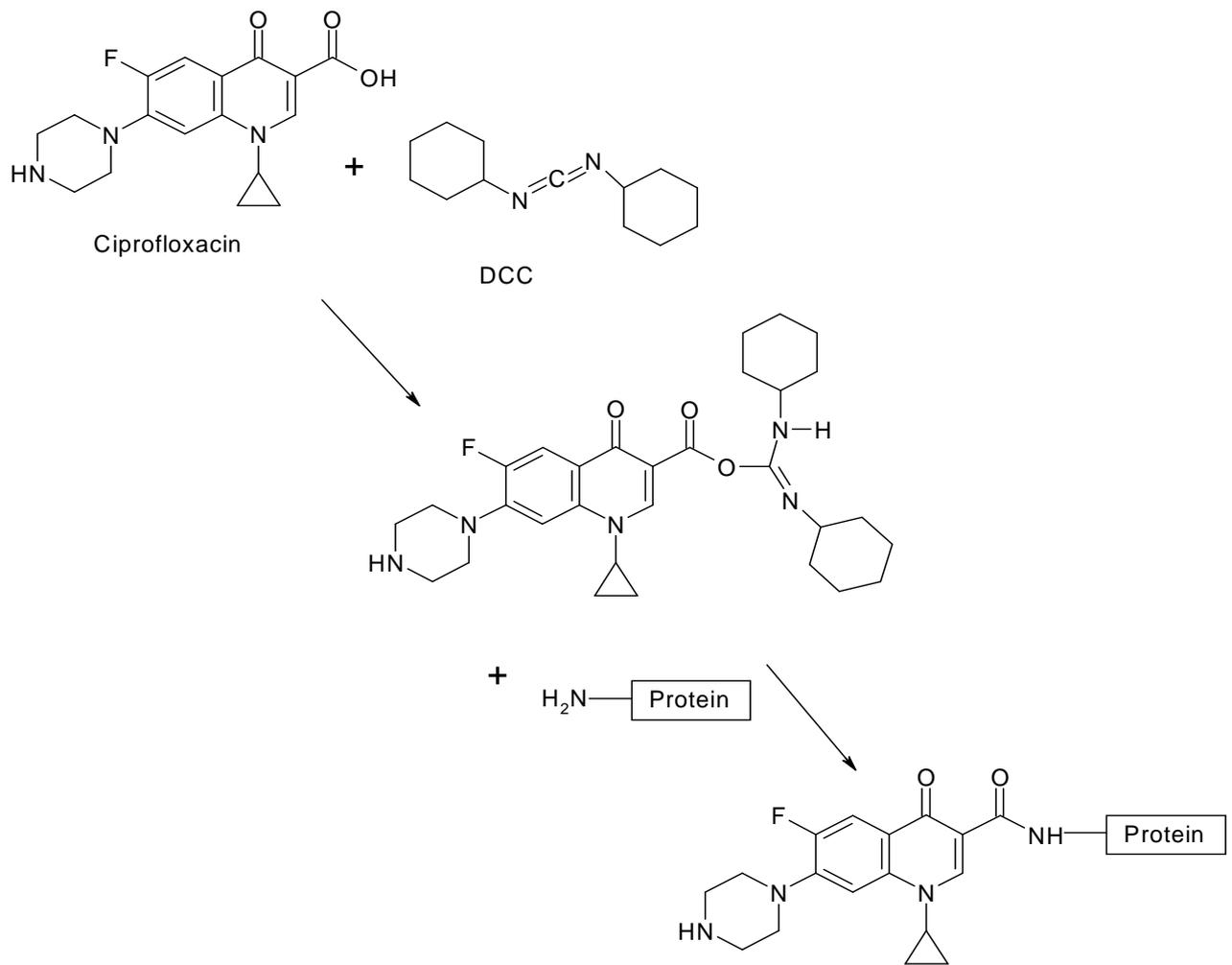


Abbildung 6: Schematische Darstellung der aktiven Ester-Kopplungsmethode

Tabelle 7: Übersicht über die verschiedenen Kopplungsansätze zur Herstellung von Fluorchinolon-Protein-Konjugaten

Fluorchinolon				Makromolekül			
Substanz	Menge (mg)	Lösungsmittel	Menge (μ l)	Bezeichnung	Menge (mg)	Lösungsmittel und Zusätze	Menge (μ l)
<u>Glutardialdehydmethode</u>							
Ciprofloxacin-Ethylendiamin	2	NaHCO ₃ (0,13 M) NaCl (0,15 M)	1000	KLH	4	NaHCO ₃ (0,13 M) NaCl (0,15 M) 2,5 % GA-PBS-Lösung	600
<u>Natriumperjodatmethode</u>							
Ciprofloxacin-Ethylendiamin	1,5	Bicarbonatpuffer	1500	HRP	4	A. dest. NaJO ₄ (0,1 M) NaBH ₄ (4 mg/ml)	1000 200 100
Ciprofloxacin-Ethylendiamin	3,8	Bicarbonatpuffer	2000	GlcOX	1	A. dest. NaJO ₄ (0,1 M) NaBH ₄ (4 mg/ml)	1000 200 150
Clinafloxacin	1,8	Bicarbonatpuffer	1800	HRP	4	A. dest. NaJO ₄ (0,1 M) NaBH ₄ (4 mg/ml)	1000 200 100
<u>Carbodiimidmethode</u>							
Ciprofloxacin	3	Bicarbonatpuffer	750	HRP	3,6	A. dest. +1,7 mg EDPC in 71 μ l A. dest.	235
Norfloxacin	3,5	DMF	1000	OVA	5	PBS + 25 mg EDPC in 1 ml PBS	2500
<u>Aktive Estermethode</u>							
Ciprofloxacin	2	DMF	500	HRP	12	NaHCO ₃ (0,13 M) 3,45 mg NHS 12,4 mg DCC	3 200 300

3.2.2 *Charakterisierung der Konjugate*

Für die Charakterisierung der Chinolon-Protein-Konjugate wurden die UV-Spektren der Konjugate im Bereich von 200 bis 600 nm mit den Einzelspektren der Chinolone und der Proteine verglichen. Durch die Ermittlung der Extinktionsdifferenz bei charakteristischen Wellenlängen konnte die Anzahl der an das jeweilige Trägerprotein gebundenen Chinolon-Moleküle und damit das Kopplungsverhältnis Chinolon zu Protein rechnerisch bestimmt werden. Chinolone weisen verschiedene Absorptionsmaxima auf: Zum einem im Bereich zwischen 300-350 nm, der für alle Chinolone gleich ist, und zum anderen in einem zweiten Bereich um 245-290 nm, der für jedes Chinolon spezifisch ist (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al., 2002). In Abbildung 7 ist das UV-Spektrum für Ciprofloxacin dargestellt. Aufgrund der sich überlagernden Absorptionsmaxima von Glukoseoxidase, Ovalbumin, KLH und denen der Chinolone war eine zuverlässige Kalkulation des Kopplungsverhältnisses nicht möglich. Es erfolgte daher für diese Protein-Konjugate lediglich eine Überprüfung der Funktionalität (Sensitivität und Spezifität) unter Verwendung des gewonnenen Antiserums. Die bei der Charakterisierung der HRP-Konjugate ermittelten Daten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Übersicht über die hergestellten Hapten-HRP-Konjugate

Kopplungsprodukt	Kopplungsmethode	Proteingehalt	Chinolongehalt	molare
		mg/ml	µg/ml	Kopplungsrate Protein : Chinolon
CiproED-HRP	Perjodat	0,97	42,6	1 : 6
Clina-HRP	Perjodat	1,01	52	1 : 6
Cipro-HRP	Carbodiimid	2,15	8,9	1 : 0,5
Cipro-HRP	aktiver Ester	1,6	47,5	1 : 4

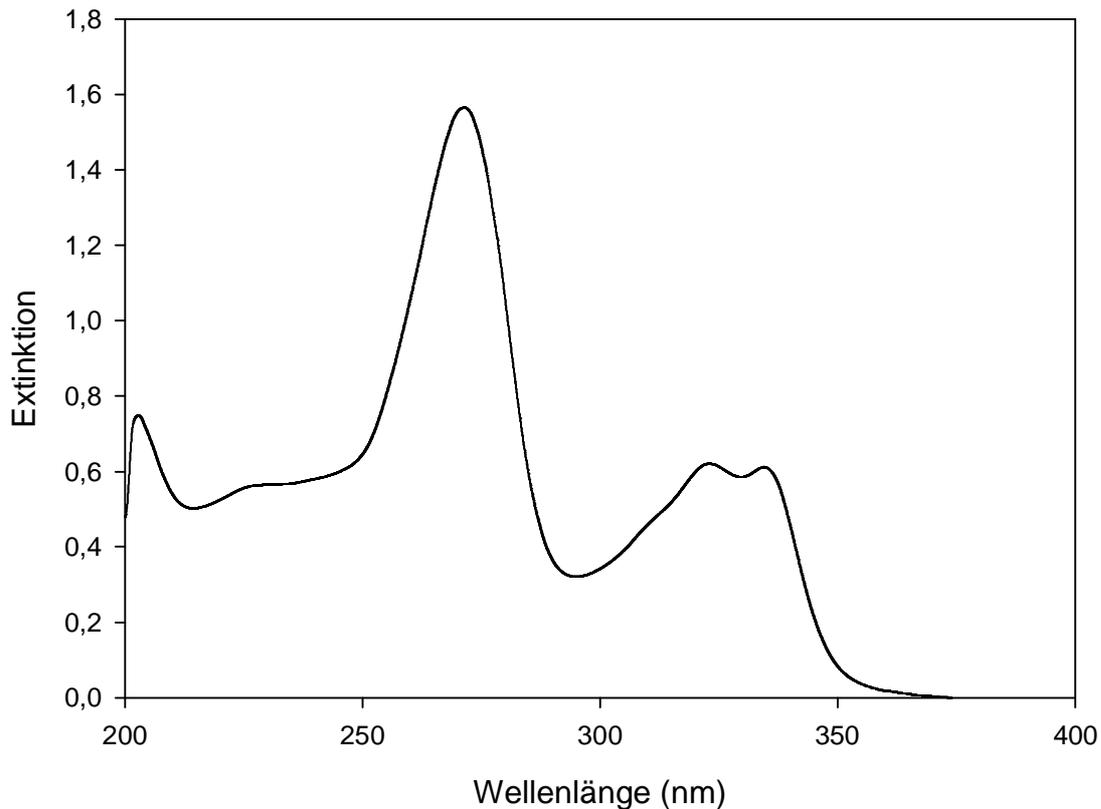


Abbildung 7: UV-Spektrum von Ciprofloxacin in PBS (10 µg/ml)

3.2.3 *Gewinnung spezifischer Antiseren*

3.2.3.1 **Immunisierung**

Mit dem unter 3.2.1.1 beschriebenen Ciprofloxacin-Ethylendiamin-KLH Konjugat wurden drei Kaninchen immunisiert. Hierzu wurde das Immunogen in sterilem A. dest. gelöst und in einem Verhältnis von 1:4 mit komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Grundimmunisierung erfolgte nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1975). Dazu wurden jedem Tier etwa 500 µg Protein, entsprechend 2 ml Emulsion, intracutan, auf 20 Stellen am Rücken verteilt, injiziert. Die Restimulierungen erfolgten subcutan mit der gleichen Proteinmenge. Die Zeitpunkte der Restimulierung, sowie die Versuchsdauer sind in Abbildung 8 angegeben.

3.2.3.2 Serumgewinnung

Den Tieren wurde ab der fünften Woche nach der Grundimmunisierung in zweiwöchigem Abstand aus der *A. auricularis rostralis* Blut entnommen. Durch Zentrifugieren wurde das Serum abgetrennt und ohne weitere Aufbereitung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.3.3 Immunisierungsverlauf

Eine erste Überprüfung des Serumtiters erfolgte fünf Wochen nach der Grundimmunisierung. Weitere Kontrollen wurden in zweiwöchigen Abständen durchgeführt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit affinitätschromatographisch gereinigten Schaf-Anti-Kaninchen-IgG in einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ beschichtet ($100\text{ }\mu\text{l/Kavität}$ in Bicarbonatpuffer) und 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absättigen unbesetzter Bindungsstellen mit 2 % OVA/PBS ($200\text{ }\mu\text{l/Kavität}$, 30 min), Waschen und Ausschlagen der Platten wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ des zu testenden Antiserums in Verdünnungsreihen (in PBS) auf die Platte pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift und eine einstündige Inkubation des Ciprofloxacin-Ethylendiamin-(PJ)-HRP (in 1 % OVA/PBS, $100\text{ }\mu\text{l/Kavität}$). Anschließend wurden die Platten wiederum gewaschen, ausgeschlagen und $100\text{ }\mu\text{l/Kavität}$ Substratlösung hinzugegeben. Nach 20 min wurde die Umsatzreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und abschließend die Farbintensität bei 450 nm gemessen. Als Titer wurde diejenige Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab. Zur Kontrolle wurden die vor der Grundimmunisierung gewonnenen Präimmunseren mituntersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen drei Kaninchen mit dem Ciprofloxacin-Ethylendiamin-Konjugat eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden konnte. Bei allen drei Kaninchen konnten erste Antikörper bereits fünf Wochen nach der Immunisierung nachgewiesen werden, der weitere Immunisierungsverlauf wies jedoch erhebliche Unterschiede auf.

Die Immunantwort der Kaninchen 1 und 2 war verhältnismäßig schwach. Auch die durchgeführten Restimulierungen in der zehnten und 20. Woche nach der Grundimmunisierung führten zu keinem deutlichen Anstieg der Serumtiter. Bei Kaninchen 3 fand die erste Restimulierung erst nach einem Titerabfall in der 16. Woche statt, wodurch eine deutliche sekundäre Immunantwort hervorgerufen wurde. Eine zweite Restimulierung in der 29. Woche brachte einen erneuten, verzögerten Titeranstieg. Nach erneutem Titerabfall wurde eine dritte Restimulierung durchgeführt, die jedoch zu keinem weiterem Titeranstieg führte. Die Titerverläufe der drei Kaninchen mit den jeweiligen Restimulierungen sind in Abbildung 8 dargestellt.

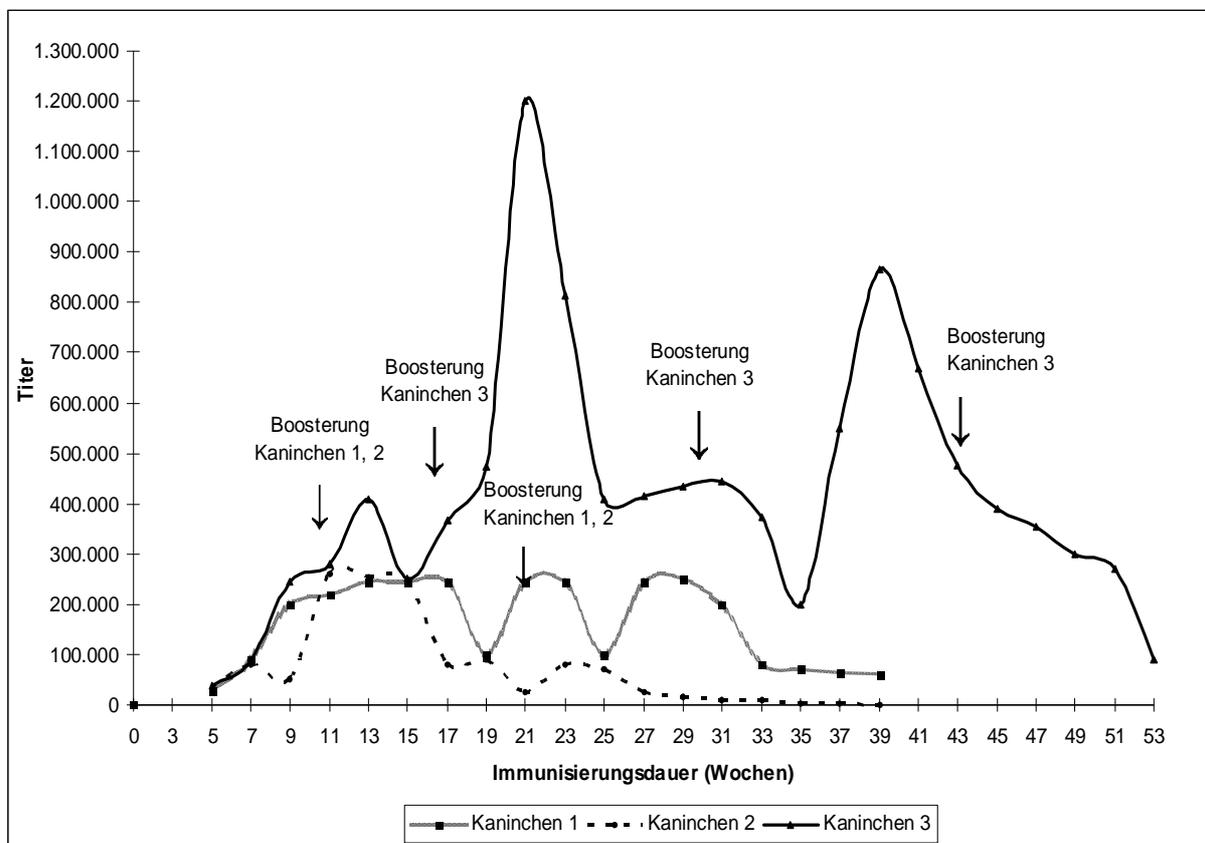


Abbildung 8: Titerverlauf der Kaninchen Nr. 1; 2; 3

3.2.4 *Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Fluorchinolonen*

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden ausschließlich die Seren von Kaninchen 3 verwendet. Die Seren dieses Tieres wurden gesammelt und zur Gewinnung der IgG-Fraktion mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung nach der von HEBERT et al. (1973) beschriebenen Methode gefällt. Hierzu wurden die Seren der einzelnen Wochen zu Pools zusammengestellt und auf ihre Sensitivität und Spezifität überprüft. Es zeigte sich, dass die höchste Testsensitivität mit dem Antiserum-Pool 1 (Serumabnahmen der 9.-28. Woche nach der Grundimmunisierung) erreicht werden konnte.

3.2.4.1 Direkter kompetitive Enzymimmuntests

Beim direkten kompetitiven Verfahren konkurrieren freies und enzymmarkiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen (EKINS, 1985), wobei der spezifische Antikörper an die Festphase gebunden ist. Die Inkubation von Enzymkonjugat, Standards und Proben erfolgt simultan, nicht gebundene Reaktionspartner werden durch Waschschrte entfernt. Schließlich führt das an die Antikörper gebundene Enzymkonjugat nach Zugabe eines spezifischen Substrates zu einer Umsatzreaktion, die umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe ist.

Zur Durchführung des direkten kompetitiven EIAs wurden Mikrotiterplatten mit dem gefällten Antiserum (Verdünnung in 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung und einem Wasch- und Trockenschritt wurden gleichzeitig Ciprofloxacin-Standards bzw. Proben, sowie das entsprechende Enzymkonjugat (siehe Tabelle 8) hinzugegeben (jeweils 50 µl/Kavität) und 2 h bei Raumtemperatur im Mikrotiterplattentaumelgerät inkubiert. Nach erneutem Waschen und Trockenschlagen erfolgte die Zugabe der Enzymsubstratlösung. Die Umsetzungsreaktion wurde nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 15 min) mit 1 mol/l H₂SO₄ (100 µl /Kavität) gestoppt und anschließend die Extinktion bei 450 nm photometrisch gemessen. Eine schematische Darstellung der Durchführung wird in Abbildung 9 gezeigt.

Zur Ermittlung der im Hinblick auf die Testsensitivität optimalen Kombinationen an Immunreagenzien wurde der Antiserum-Pool 1 gegen die Hapten-Enzymkonjugate titriert (Schachbrett-Titration). Diejenigen Kombinationen aus Antiserum und Enzymkonjugat, die in einem Extinktionswert des antigenfreien Kontrollansatzes (= ohne Zusatz von Antibiotikum) von etwa 1,0 resultierten und dabei für den chinolonhaltigen (B) und -freien Vergleichsansatz (B₀) einen hohen Extinktionsunterschied (B/B₀) aufwiesen, wurden für die Erstellung von Standardkurven verwendet. Je nach Fragestellung wurden Standardkurven für Ciprofloxacin in Puffer (PBS), in 10 % Magermilch/A. dest. bzw. in 8 % Methanol/PBS angelegt. Als Maß für die Empfindlichkeit des Testsystems wurde der 50 %-Wert bestimmt, d.h. diejenige Chemotherapeutikum-Konzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Antigens an die Antikörper um 50 % reduzierte.

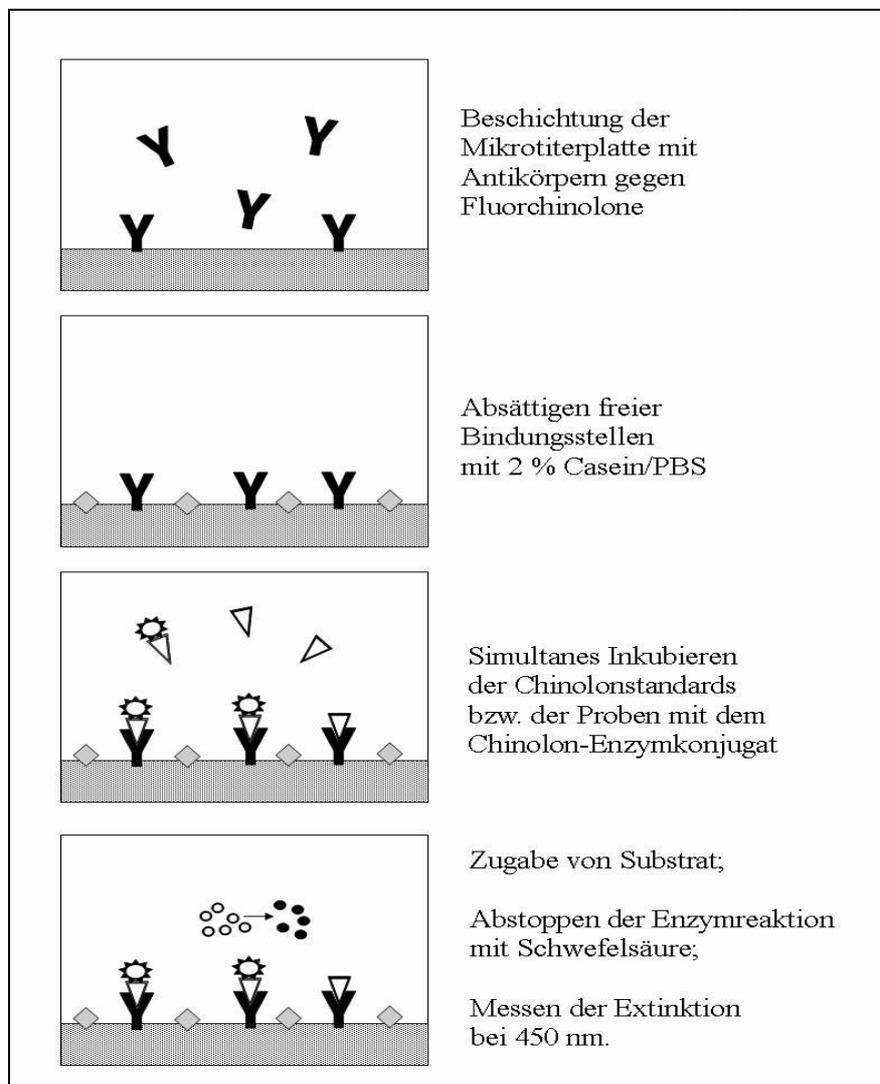


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Testdurchführung eines direkten kompetitiven Enzymimmuntests

3.2.4.2 Direkter kompetitive Enzymimmuntests unter Verwendung eines zweiten Antikörpers als Festphase

Beim direkten kompetitiven Enzymimmunoassay mit einem zweiten Antikörper als Festphase, ein als „Double Antibody Solid Phase“-Technik (DASP-Technik) beschriebenes Verfahren, werden die spezifischen, gegen Ciprofloxacin gerichteten Antikörper an einen zweiten, gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper (Schaf-Anti-Kaninchen-IgG), der als Festphase dient, gebunden. Bei dieser direkten kompetitiven Testanordnung konkurrieren freies und enzymmarkiertes Antigen bei simultaner Inkubation um die spezifischen Antikörperbindungsstellen. Durch Waschen der Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen Reaktionsschritten werden nicht gebundene Reagenzien entfernt. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass Rohserum ohne Aufbereitung verwendet werden kann.

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit affinitätschromatographisch gereinigtem Anti-Kaninchen-IgG-Serum vom Schaf in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS-Lösung 30 min abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung und Ausschlagen wurde Antiserum (100 µl/Kavität) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation, erneutem Waschen und Ausschlagen wurden gleichzeitig der Ciprofloxacin-Standard (50 µl/Kavität) und das Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP-Konjugat (50 µl/Kavität) hinzu gegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.2.4.1 beschrieben.

3.2.4.3 Indirekte kompetitive Enzymimmuntests

Beim indirekten kompetitiven Verfahren konkurrieren freies Antigen mit dem an die Festphase gebundenen Antigen-Protein-Konjugat um Antikörperbindungsstellen. Gebundene spezifische Primärantikörper werden nach einem Waschschrift über enzymmarkierte Sekundärantikörper nachgewiesen. Auch bei dieser EIA-Variante ist die nach Substratzugabe zu beobachtende Farbentwicklung umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe.

Zur Durchführung des indirekten kompetitiven EIAs wurden Mikrotiterplatten mit einem der beiden Protein-Konjugate (Norfloxacin-OVA bzw. Ciprofloxacin-Ethylendiamin-GlcOx gelöst in Bicarbonatpuffer) beschichtet (100 μ l/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung und einem Wasch- und Trockenschritt wurden simultan Ciprofloxacin-Standards bzw. Proben sowie die spezifischen Antikörper hinzugegeben (jeweils 50 μ l/Kavität) und 1 h bei Raumtemperatur im Mikrotiterplattentaumelgerät inkubiert. Nach Auswaschen ungebundener Reagenzien wurden die Mikrotiterplatten mit 100 μ l/Kavität Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:3000 in 1 % Casein/PBS) für eine Stunde inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu dem in 3.2.4.1 beschriebenen Verfahren. Eine schematische Darstellung der Durchführung wird in Abbildung 10 gezeigt.

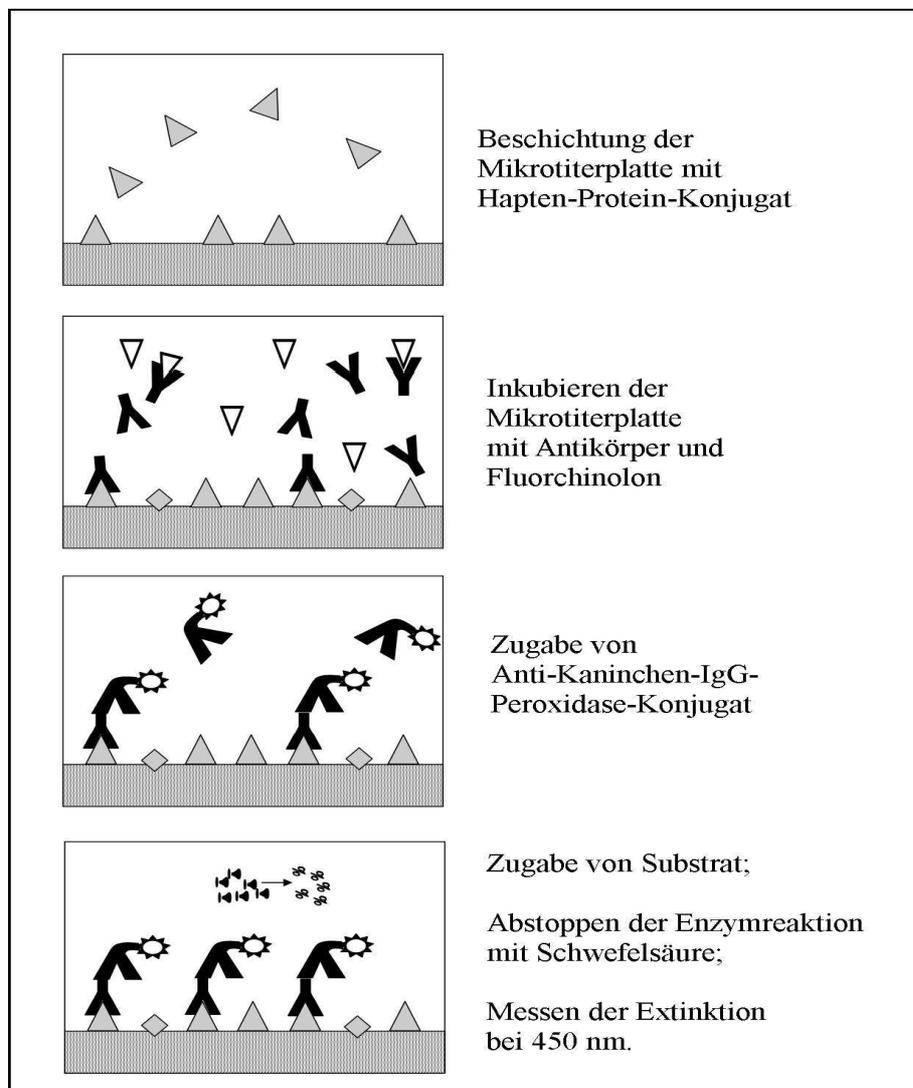


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Testdurchführung eines indirekten kompetitiven Enzymimmuntests

3.2.4.4 Sensitivität der etablierten Enzymimmuntests

Die wesentlichen Ergebnisse, die bei der Etablierung der kompetitiven EIAs zum Nachweis von Ciprofloxacin erhalten wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Nur vier der sechs überprüften Hapten-Protein-Konjugate, die in den verschiedenen EIA-Formaten als markierte Antigene eingesetzt wurden, erwiesen sich als geeignet für die Erstellung eines sensitiven Testsystems. So zeigte das eingesetzte Kaninchenserum keine bzw. nur eine sehr schwache Affinität zu den beiden Konjugaten (siehe Tabelle 8), bei denen Ciprofloxacin über die Carboxylgruppe mittels Carbodiimid – bzw. aktiver Estermethode an Peroxidase gekoppelt worden war (Ergebnisse nicht dargestellt).

Wurden hingegen die mittels Perjodatmethode hergestellten Ciprofloxacin-Ethylendiamin-Glykoprotein-Konjugate in die verschiedenen EIA-Formate eingesetzt, konnten sowohl eine Reaktivität des Antiserums mit dem Konjugat als auch eine dosisabhängige Hemmung dieser Bindung durch die Zugabe von freien Ciprofloxacin beobachtet werden. Die 50 % Hemmungsdosen lagen je nach EIA-System zwischen 16,6 und 19,3 ng Ciprofloxacin/ml, wobei tendenziell bei Verwendung des direkten EIA eine bessere Reproduzierbarkeit zu verzeichnen war (Tabelle 9). Eine deutliche Steigerung der Sensitivität trat bei den EIA-Verfahren auf, bei denen Strukturanaloga des Ciprofloxacins - wie Clinafloxacin bzw. Norfloxacin - als markierte Antigene eingesetzt wurden. Die 50 % Hemmungsdosen lagen hier bei 6 bzw. 4,8 ng/ml. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit wies das Enzymimmunsystem unter Verwendung von Clinafloxacin-HRP niedrigere Streubreiten auf als das mit dem Norfloxacin-OVA-Konjugat. Typische Standardkurven für die einzelnen Systeme finden sich in den Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 13.

Tabelle 9: Einfluss des markierten Antigens auf wichtige Kenndaten von Ciprofloxacin-Standardkurven in verschiedenen EIA-Formaten

	Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP		Ciprofloxacin- Ethylendiamin- GlcOx	Clinafloxacin-HRP	Norfloxacin- Ovalbumin
	direkte Beschichtung	DASP-Technik			
Konjugat-Verdünnung	1:25 000	1:32 000	1:500	1:30 000	1:5 000
Antiserum-Verdünnung	1:2 000	1:8 000	1:1000	1:2 000	1:1 000
<u>50%- Dosis:</u>					
Mittelwert (ng/ml)	16,63	18,7	19,3	6,07	4,8
Standardabweichung (ng/ml)	1,37	3,9	5,42	1,24	1,35
Minimalwert (ng/ml)	15,1	13,9	15	4,6	3,6
Maximalwert (ng/ml)	19,4	25,3	28,4	8,3	6,7
Anzahl der Kurven	8	8	5	7	8

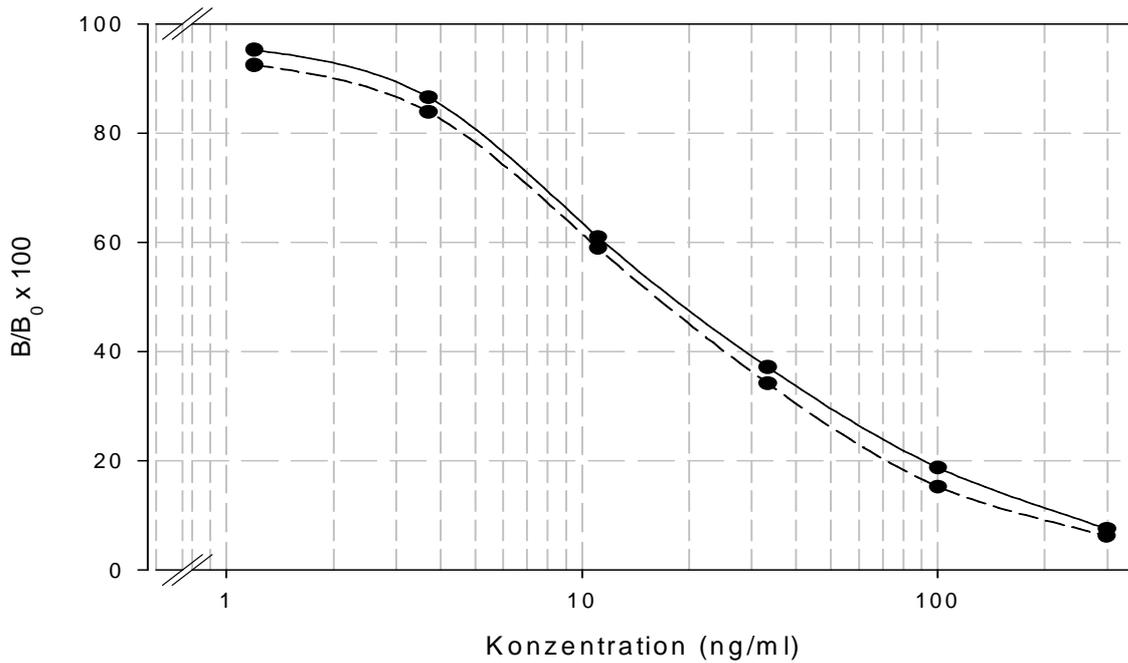


Abbildung 11: Charakteristische Standardkurven für Ciprofloxacin (in PBS) bei Verwendung von Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP (---direkte Beschichtung bzw. —DASP-Technik)

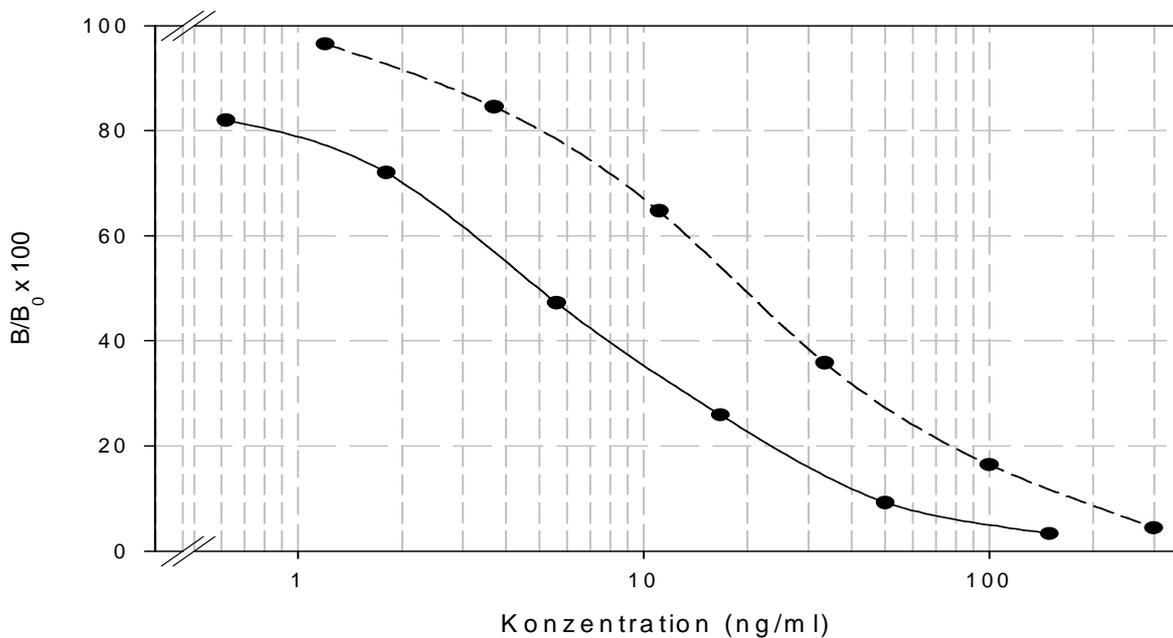


Abbildung 12: Charakteristische Standardkurven für Ciprofloxacin (in PBS) im indirekten EIA bei Verwendung von Norfloxacin-Ovalbumin (—) bzw. Ciprofloxacin-Ethylendiamin-GlcOx (---)

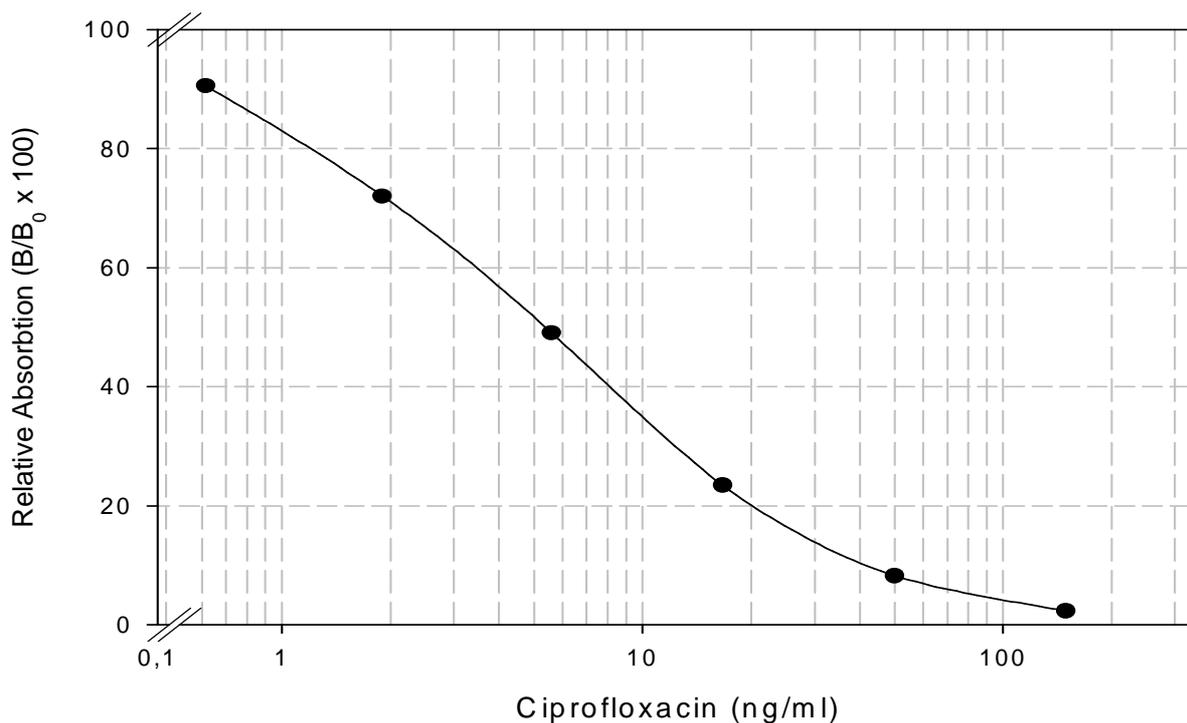


Abbildung 13: Charakteristische Standardkurve für Ciprofloxacin (in PBS) bei Verwendung von Clinafloxacin-HRP

3.2.4.5 Spezifität des Antiserums

Zur Bestimmung der Spezifität des Antiserums (Kaninchen 3, Serum der 9.-28. Woche) in den beschriebenen kompetitiven EIAs wurden Wettbewerbsversuche mit Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Ciprofloxacin-Ethylendiamin, Clinafloxacin, Clioquinol, Danofloxacin, Enoxacin, Enrofloxacin, Flumequin, Ibafoxacin, Levofloxacin, Lomefloxacin, Marbofloxacin, Nalidixinsäure, Norfloxacin, Ofloxacin, Oxolinsäure, Pazufloxacin, Pipemidsäure, Sarafloxacin, Sparfloxacin, Tosufloxacin) durchgeführt. Für jede dieser Substanzen wurden Standardkurven im Bereich von 10 µg/ml bis 0,6 ng/ml angelegt, die 50 %-Werte bestimmt und unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der überprüften Substanzen die relative Kreuzreaktivität nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50 \% \text{ Dosis (R)}}{50 \% \text{ Dosis (X)}} \times 100$$

(R = Referenzchinolon Ciprofloxacin; X = Testchinolon)

Die relativen Kreuzreaktionen des Antiserums gegen Ciprofloxacin in Abhängigkeit von verwendeten EIA-Format bzw. Hapten-Proteinkonjugat (Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP, Clinafloxacin-HRP und Norfloxacin-OVA) sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Standardkurven hierfür wurden in PBS angelegt.

Aus den Kompletionsversuchen ging hervor, dass die in den einzelnen Systemen ermittelten Kreuzreaktionen nicht stark voneinander abwichen. Unter Verwendung von Ciprofloxacin als Referenzantibiotikum wurden in allen EIA-Systemen für Danofloxacin Kreuzreaktionen von weit über 100 % bestimmt. Für Enrofloxacin ergab sich folgendes Bild: im indirekten EIA unter Verwendung von Norfloxacin-OVA wurde eine annähernd 100%-ige Kreuzreaktion beobachtet, bei direkten Testanordnungen mit Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP und Clinafloxacin-HRP hingen nur 54 - 68 %. Für alle anderen überprüften Chinolone wichen die Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Testsystemen nicht stark voneinander ab. Insgesamt konnten für elf der 22 ausgetesteten Substanzen Kreuzreaktionen von über 1 % ermittelt werden. Tabelle 10 zeigt die relativen Kreuzreaktionen des direkten Testsystems unter Verwendung von Ciprofloxacin-HRP. Weitere getestete Chinolone (Clioquinol, Pipemidsäure Ibafoxacin, Sarafloxacin, Difloxacin, Tosufloxacin und Pazufloxacin) zeigten bei überprüften Konzentration von 10 µg/ml keine Reaktion.

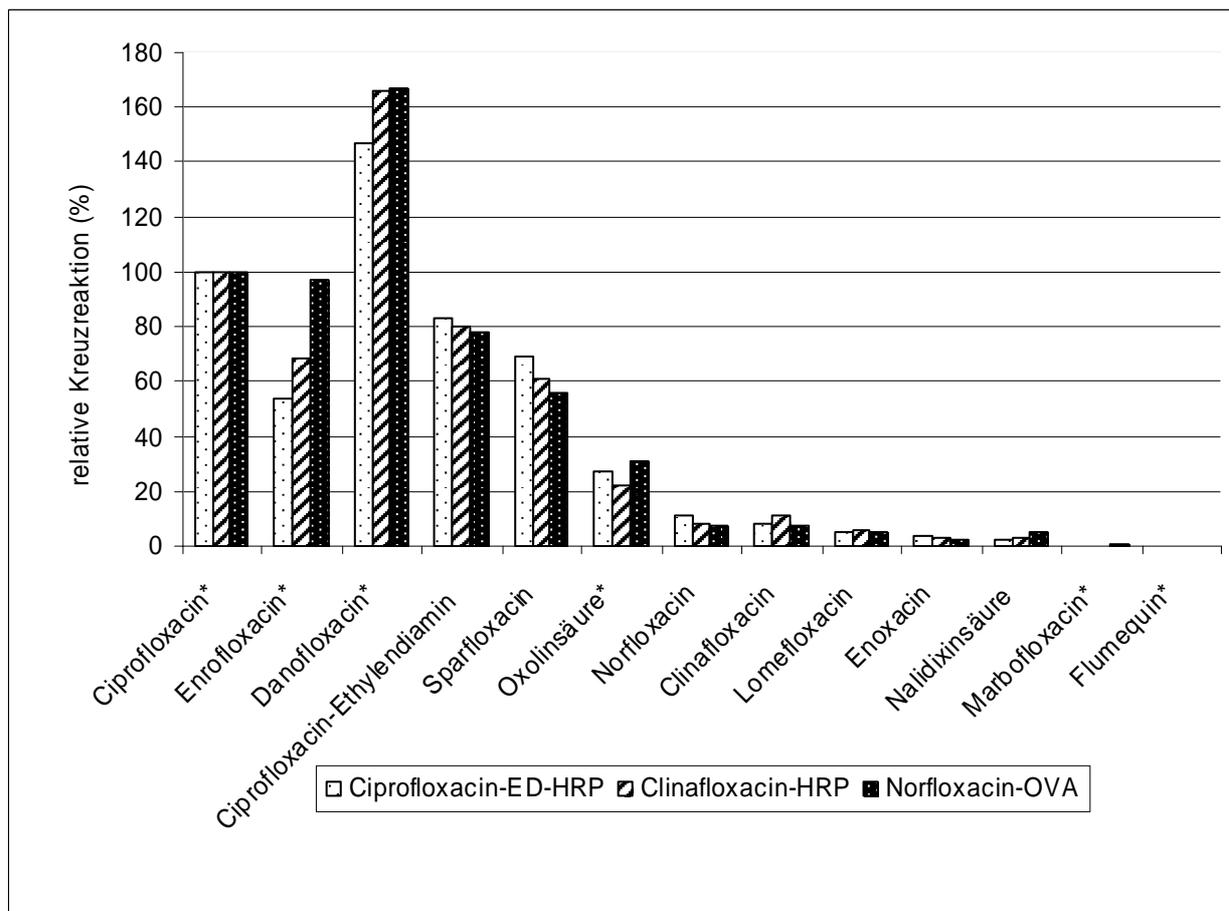


Abbildung 14: Vergleich der relativen Kreuzreaktionen des Antiserums in verschiedenen EIA-Testformaten

* Substanzen mit MRL laut EU-Verordnung 2377/90

3.2.5 *Entwicklung eines Agardiffusionstests zum Nachweis von Fluorchinolonen*

Um für die geplanten Versuche zum Vorkommen von Chinolon-Antibiotika in Tankmilch bzw. Garnelen neben dem EIA ein zweites sensitives Analyseverfahren zur Verfügung zu haben, wurde in weitergehenden Versuchen ein alternatives Testsystem auf Basis eines Agardiffusionstests entwickelt. Hierzu wurde ein von SUHREN et al. (1996) beschriebener Test modifiziert und als Referenzverfahren zum Nachweis für Fluorchinolone verwendet. Als Mikroorganismus für den Test wurde *E. coli* ATCC 11303 eingesetzt.

Tabelle 10: Relative Kreuzreaktionen des Kaninchen-Antiserums mit anderen Chinolon-Antibiotika im direkten EIA bei Verwendung eines Ciprofloxacin-ED-HRP-Konjugates

Substanz	Molekulargewicht g/mol	50 % Wert (ng/ml)	relative Kreuzreaktion (%)
Ciprofloxacin*	331,2	17,5	100
Enrofloxacin*	359,4	35,3	53,7
Danofloxacin*	357,4	12,8	147
Ciprofloxacin- Ethylendiamin	305,2	19,4	82,9
Sparfloxacin	392,4	29,8	69,4
Oxolinsäure*	261,2	51,2	27
Norfloxacin	319,3	158	10,6
Lomefloxacin	351	348	5,3
Enoxacin	320,3	435	3,9
Marbofloxacin*	362	9580	0,2
Flumequin*	261,3	10000	0,1

* Substanzen mit MRL laut EU-Verordnung 2377/90

3.2.5.1 Etablierung eines Agardiffusionstests

Als Nährmedium wurde Standard II Nähragar (35 g/l) verwendet, dem 1,6 g/l Laktose zugesetzt wurde. Das Medium wurde in A. dest. aufgelöst und zum Sieden gebracht. Anschließend wurden 0,05 µg/ml Trimethoprim und 0,18 g/l Neutralrot dazugegeben. Unter ständigem Durchmischen wurde der pH-Wert der Suspension mit Natronlauge (5 mol/l) auf 9,3 eingestellt. Nach Autoklavieren für 15 min bei 121°C und 2,5 bar wurde das Nährmedium auf ca. 40° C heruntergekühlt und anschließend unter ständigem Rühren der Testmikroorganismus (*E. coli* ATCC 11303; 4×10^5 pro ml Agar) zugegeben. Diese Suspension wurde dann zügig in Petrischalen gegossen (ca. 10 ml/Petrischale), und nach Erstarren des Mediums mit einer zweiten dünnen Schicht, bestehend aus Standard II-Nähragar (12,8 g/l) ohne Zusatz von Testmikroorganismen, überschichtet. Nach Verfestigung beider Schichten wurden unter sterilen Bedingungen mehrere Löcher (ø 13 mm) für die Proben in den Nährboden gestanzt. Zur Testdurchführung wurden 100 µl der zu untersuchenden Probe

in die Kavitäten verbracht und die Platten 24 h bei 36° C bebrütet (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Ein deutlich sichtbarer Hemmhof und eine Verfärbung des zugesetzten Indikators wurden als positives Testergebnis gewertet. Zur Bestimmung der Sensitivität wurde Milch mit unterschiedlichen Konzentrationen (1,25 – 1000 ng/ml) von Chinolonen dotiert und in den Test eingesetzt. Anhand der Größe der Hemmhöfe wurden die Nachweisgrenzen ermittelt (siehe Tabelle 11), wobei ein minimaler Durchmesser von 15 mm als positive Reaktion gewertet wurde.

Um die Spezifität des Tests für die Gruppe der Chinolone zu sichern, musste ausgeschlossen werden, dass das Wachstum des Testmikroorganismus auch durch andere Antibiotika bzw. Chemotherapeutika gehemmt wird. Hierzu wurden folgende Substanzen getestet: Chloramphenicol, Ceftiofur, Cefquinom, Cloxacillin, Gentamicin, Oxytetracyclin, Penicillin G, Spiramycin, Sulfamethazin, Sulfathiazol, Thiamphenicol und Trimethoprim. Diese Substanzen wurden jeweils in Konzentrationen entsprechend dem MRL bzw. dem doppelten MRL getestet. Daneben wurden auch noch mit 1 µg Antibiotika/ml Milch dotierte Proben überprüft.

Der Agardiffusionstest zeigte eine hohe Sensitivität gegenüber einer Reihe von Chinolonen. So konnte Ciprofloxacin noch bis zu einer Konzentration von 1,25 – 2,5 ng/ml nachgewiesen werden. Für weitere neun Fluorchinolone lag die Nachweisgrenze unter 50 ng/ml (Tabelle 11). Die Überprüfung der Spezifität zeigte, dass bei den anderen überprüften Antibiotika keine Wachstumshemmung des Testmikroorganismus auftrat. Eine Ausnahme hiervon bildeten Ceftiofur und Cefquinom, bei denen allerdings erst bei Konzentrationen von 1 µg/ml positive Ergebnisse erhalten wurden.

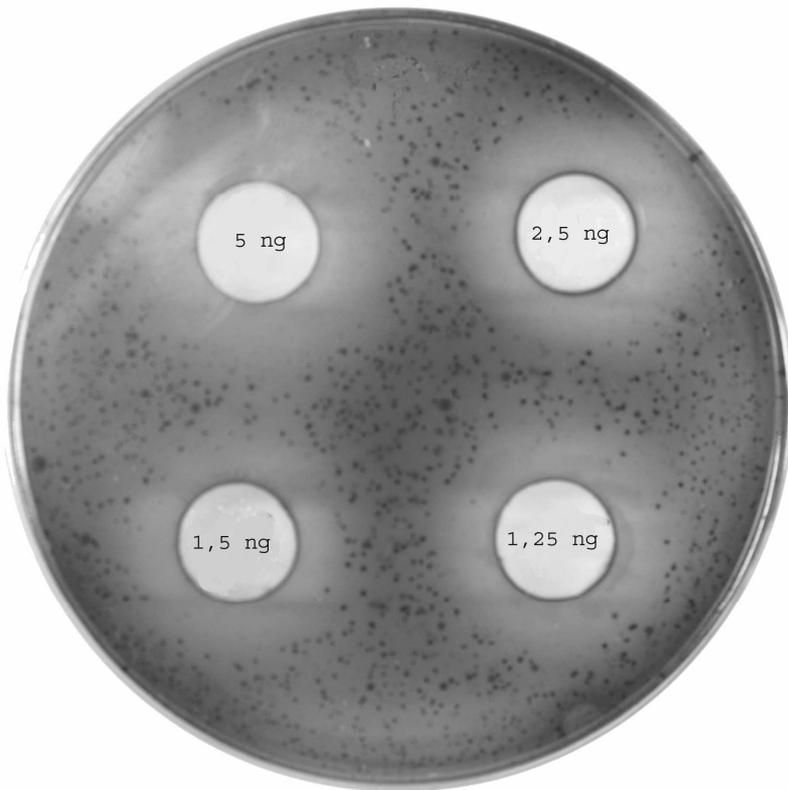


Abbildung 15: Agardiffusionstest nach Bebrütung bei 37 °C, 24 h;
Untersuchung von Ciprofloxacin

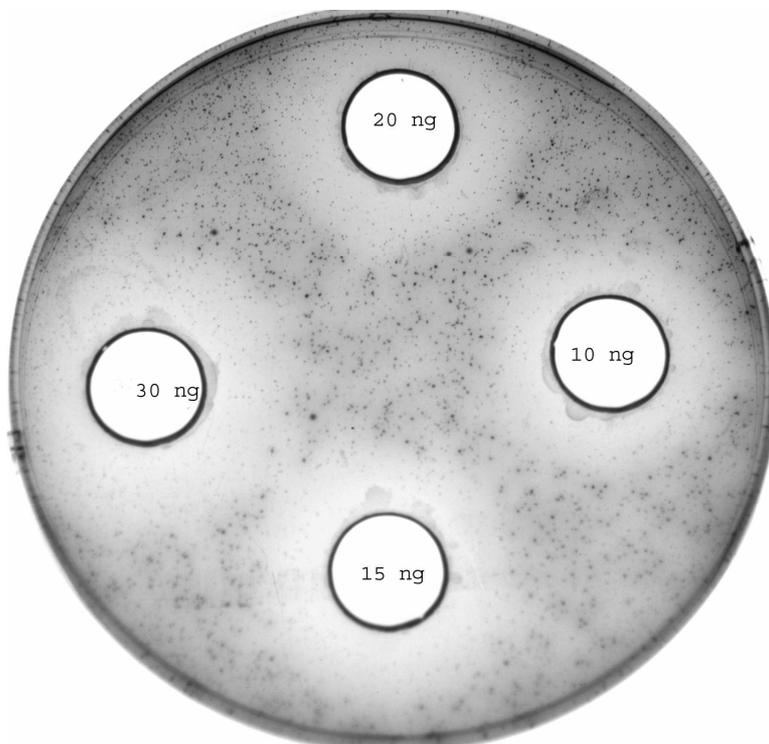


Abbildung 16: Agardiffusionstest nach Bebrütung bei 37 °C, 24 h;
Untersuchung von Sparfloxacin

Tabelle 11: Nachweisgrenzen der Chinolone im Agardiffusionstest

Fluorchinolon	Überprüfte Konzentrationsbereiche (ng/ml)	Nachweisgrenze (ng/ml)
Ciprofloxacin	0,75 - 10	1,25 - 2,5
Ciprofloxacin-Ethylendiamin	100 - 500	250
Clinafloxacin	1,25 - 10	2,5 - 5
Clioquinol	500 - 1000	800 - 1000
Danofloxacin	1,25 - 10	2,5
Difloxacin	100 - 500	200
Enoxacin	50 - 200	100
Enrofloxacin	2,5 - 10	5
Flumequin	100 - 500	300
Ibaflin® (Ibafloxacin)	100 - 500	250
Levofloxacin	5 - 20	10
Lomefloxacin	50 - 100	65 - 70
Marbofloxacin	2,5 - 20	5
Nalidixinsäure	500 - 1000	700 - 1000
Norfloxacin	20 - 100	50
Ofloxacin	7,5 - 30	15
Oxolinsäure	100 - 500	450 - 500
Pazufloxacin	500 - 1000	700 - 900
Pipemidsäure	500 - 1000	800 - 1000
Sarafloxacin	10 - 100	20
Sparfloxacin	5 - 20	10
Tosufloxacin	500 - 1000	700 - 900

3.2.6 *Anwendung der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Fluorchinolonen*

Die Überprüfung der Praktikabilität erfolgte anhand von künstlich und natürlich kontaminierten Proben.

3.2.6.1 *Untersuchung von Milch*

3.2.6.1.1 *Optimierung des Enzymimmuntests/Probenvorbereitung*

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des enzymimmunologischen Nachweisverfahrens wurde der direkte enzymimmunologische Test unter Verwendung von Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP zur Untersuchung von Milch auf Chinolonrückstände eingesetzt. Da hierfür die Standardkurven in 10 % Magermilch/A. dest. Lösung angelegt werden sollten, wurde der EIA erneut ausgetitriert und optimiert. Hierbei zeigten sich, dass bei einer Antiserumverdünnung von 1:2 000 und einer Ciprofloxacin-Ethylendiamin-HRP-Verdünnung von 1:20 000 die höchste Sensitivität des Verfahrens erzielt werden konnte. Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Möglichkeiten der Probenaufbereitung wie Entfetten und Erhitzen überprüft.

3.2.6.1.2 *Untersuchung künstlich und natürlich kontaminierter Milch*

In Voruntersuchen wurde festgestellt, dass durch Entfetten der Milch mittels Zentrifugation (2500 x g; 4 °C; 15 min) eine unspezifische Beeinflussung des EIAs vermieden werden konnte. Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten wurde entfettete Konsummilch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ciprofloxacin künstlich kontaminiert, und im EIA gegen eine Ciprofloxacin-Standardkurve, angelegt in 10 %-iger Magermilchlösung, vermessen. Die einzelnen Konzentrationsniveaus mit ihren dazugehörigen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Im Konzentrationsbereich von 25 bis 100 ng/ml lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate bei 92,3 %.

Tabelle 12: Wiederfindungsraten von Ciprofloxacin in künstlich kontaminierten Milchproben

Ciprofloxacin-Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%)	Wiederfindung (%)	n
100	89	22,2	25,0	89	4
50	45	7,70	17,2	90	4
25	25	8,48	34,6	98	4

Auch die Einsetzbarkeit des EIA zur Untersuchung natürlich kontaminierter Milch wurde überprüft. Hierzu wurden die Tages-Gemelke (morgens und abends) eines Kamels und einer Kuh, die systemisch mit Baytril® (Wirkstoff: Enrofloxacin) behandelt waren, mittels des optimierten EIAs sowie des Agardiffusionstests und des BRT-Hemmstofftests untersucht. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Ausscheidung über die Milch für die behandelten Tiere über mehrere Tage, dargestellt als Ciprofloxacin-Äquivalente. Es wird deutlich, dass bereits nach wenigen Melkzeiten Konzentrationslevel unterhalb des MRL-Wertes für Milch erreicht wurden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit denen des Agardiffusionstests überein. Die Ergebnisse des BRT-Hemmstofftests waren alle negativ, was aufgrund der geringen Empfindlichkeit dieses Hemmstofftestes gegenüber Chinolonen zu erwarten war.

Weiterhin wurden 47 hemmstoff-negative Tankmilchproben aus der Untersuchungstätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. untersucht. Die Proben wurden bei -18°C bis zum Untersuchungszeitpunkt gelagert und zur Analyse bei ca. 43°C im Wasserbad aufgetaut. Vor der EIA-Untersuchung wurde mittels BRT-Hemmstofftest die Hemmstoff-Freiheit der Proben erneut überprüft. Hierbei konnte die Abwesenheit von β -Lactam-Antibiotika in den Proben bestätigt werden. Für die Untersuchung mittels EIAs wurden die Proben wie unter 3.2.6.1.1 beschrieben entfettet. Zur Kontrolle wurden alle Proben zusätzlich mit dem modifizierten *E. coli* Plattentest untersucht. Alle 47 Milchproben reagierten im EIA und im modifizierten *E. coli* Plattentest negativ. Falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Matrixeffekten wurden im EIA nach Entfetten der Proben nicht beobachtet.

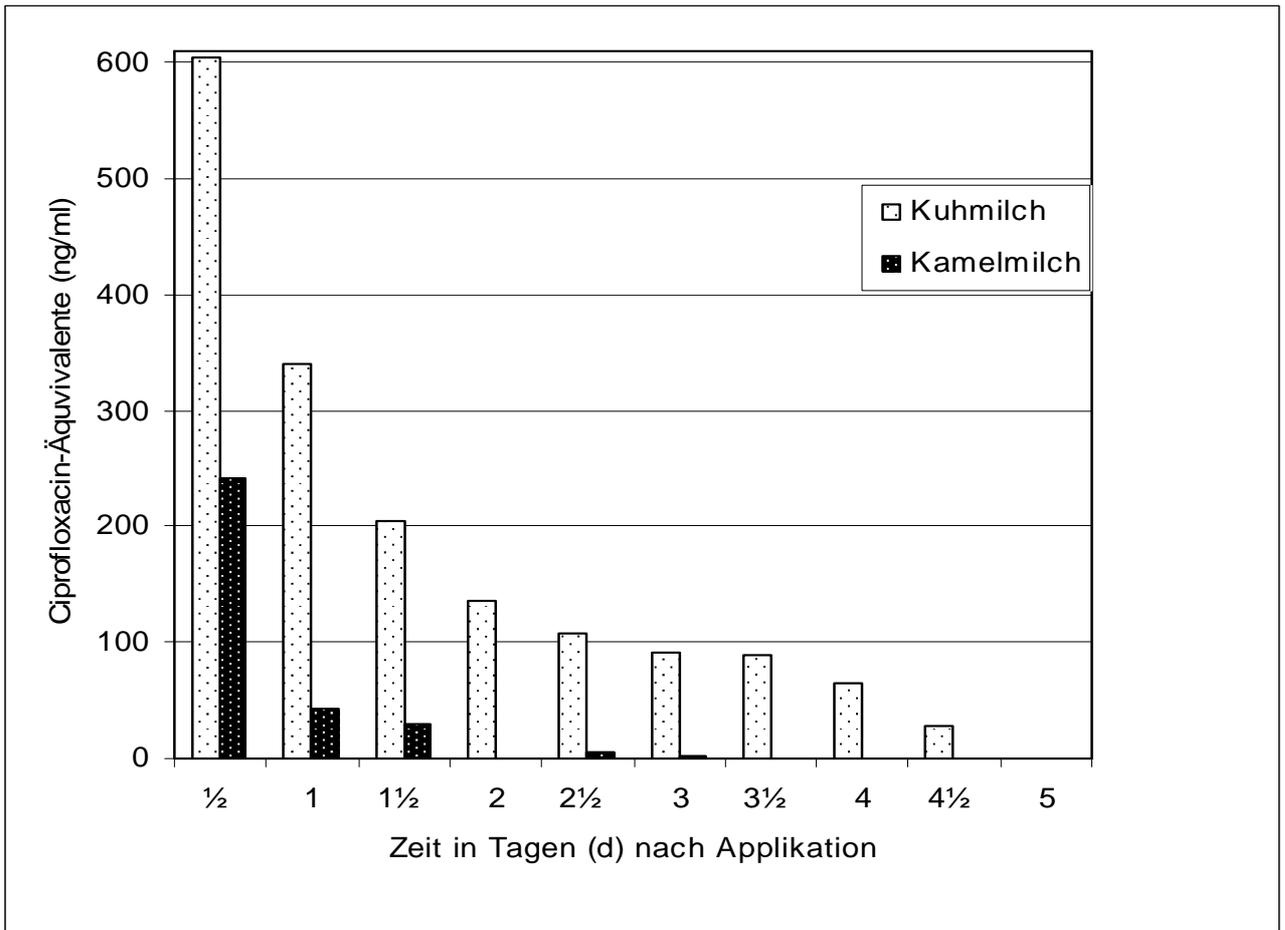


Abbildung 17: Untersuchung von Milchproben behandelter Tiere mit Baytril®.

Die Kamelmilch 2d nach Applikation stand nicht zur Verfügung.

3.2.6.2 Untersuchung von Garnelen

Da Fluorchinolone in Aquakulturen häufig zur Bekämpfung pathogener Erreger eingesetzt werden, sollte überprüft werden, inwieweit Rückstände von Gyrasehemmern in Garnelen, die auf dem deutschen Markt angeboten werden, eine Rolle spielen.

3.2.6.2.1 Optimierung des Enzymimmuntests

Die Überprüfung der Anwendbarkeit der enzymimmunologischen Nachweisverfahren zur Untersuchung von Garnelen wurde mit dem direkten Testformat unter Verwendung der

heterologen Testanordnung durchgeführt. Die Standardkurve wurde hierfür in 8 %- igem Methanol/PBS angelegt, so dass die Antiserum-Konzentration und die Clinafloxacin-HRP-Konjugat-Konzentration angepasst werden mussten. Es zeigte sich, dass eine optimale Sensitivität mit einer Verdünnung von 1:30 000 für das Clinafloxacin-HRP-Konjugat und 1:2 000 für das Antiserum erreicht wurde.

3.2.6.2.2 *Extraktion der Proben*

Das Probenmaterial wurde mit Hilfe eines Mixgerätes zerkleinert und anschließend bis zur Analyse in verschließbaren Glas-Reagenzgläsern gelagert. Zur Extraktion wurde standardmäßig in Anlehnung an gängige Extraktionsverfahren folgende Methode verwendet:

Je 1 g repräsentatives Probenaliquot wurde in ein Reagenzglas eingewogen und mit 3 ml 80 %-igem Methanol/A. dest. versetzt. Anschließend wurde die Probe mittels Ultraturrax homogenisiert (1 min; 8 500 x g) und dann für weitere 30 min im Überkopfschüttler extrahiert. Anschließend wurde die Probe einem Zentrifugationsschritt (15 min, 2500 x g , 4 °C) unterzogen. Der so erhaltene Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, 1:10 in PBS verdünnt und im Vierfachansatz in den kompetitiven EIA eingesetzt.

3.2.6.2.3 *Bestimmung der Wiederfindungsraten und Untersuchung von Garnelenproben*

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit wurden Garnelenproben vor der Extraktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ciprofloxacin versetzt, wie unter 3.2.6.2.2 beschrieben extrahiert und in den EIA eingesetzt. Die hierbei angelegte Verdünnung des Rohextraktes war notwendig, um Probenmatrixeffekte zu eliminieren. Dadurch stieg die Nachweisgrenze des EIAs auf ca. 20 ng Ciprofloxacin/g. Die durchschnittliche Wiederfindung der dotierten Proben lag bei 98,7 %. In Tabelle 13 sind die Wiederfindungsraten der einzelnen Konzentrationsniveaus dargestellt.

Tabelle 13: Wiederfindungsraten von Ciprofloxacin in künstlich kontaminierten Garnelen

Ciprofloxacin (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	Standard- abweichung	Variationskoeffizient (%)	Wiederfindung (%)	n
200	199,3	21,5	11	99,6	3
100	98,4	18,8	19	98,4	5
50	49	10,5	22	98	5

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des für Garnelen optimierten Tests wurden 37 Garnelen-Proben untersucht, die aus örtlichen Supermärkten stammten. Bei den Proben handelte es sich um Vertreter der Spezies *Penaeus ssp.*, *Pandalus borealis* und *Procambarus clarkii*, die aus Aquakulturen verschiedener Länder (Indonesien, China und Thailand), sowie aus dem indischen und pazifischen Ozean und dem Atlantik stammten. Parallel wurden die Proben mittels des modifizierten *E. coli* -Plattentests überprüft. Keine der 37 Garnelen-Proben führte zu einem positiven Ergebnis in den zwei Testsystemen. Somit enthielt keine der Proben mit dem EIA bzw. Agardiffusions-Test erfassbare Chinolone oberhalb der entsprechenden Nachweisgrenzen (Enzymimmuntest ca. 20 ng/ml, Agardiffusions-Test ca. 8 ng/ml).

4 DISKUSSION

Chinolone werden häufig zur Behandlung bakterieller Infektionen in der Veterinärmedizin eingesetzt. Die weite Verbreitung dieser Substanzen, sowie eine unsachgemäße Anwendung chinolonhaltiger Präparate, wie z.B. die Nichteinhaltung der gesetzlich festgelegten Wartezeiten, können zu Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft führen. Dies und der steigende Einsatz von Chinolon-Antibiotika in der Tierproduktion wird auch im Hinblick auf die mögliche Entstehung von Medikamentenresistenzen bei pathogenen Bakterien (FAO/NACA/WHO, 1999) als problematisch angesehen. So führte der bedenkliche Anstieg von Fluorchinolon-resistenten *Campylobacter*-Stämmen dazu, dass von der FDA (2005) die Zulassung von Baytril® (Wirkstoff: Enrofloxacin) für den Einsatz bei Geflügel widerrufen wurde. Ein weiteres ernstzunehmendes Problem stellt die illegale Verwendung von in der Veterinärmedizin nicht zugelassenen Chinolonen dar.

Innerhalb der EU wurden zur Vermeidung gesundheitlicher Risiken für diese antimikrobiell wirksamen Substanzen Höchstmengen (maximum residue limits, MRLs) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs festgesetzt (12 Tabelle 2). Dabei ist von wesentlicher Bedeutung, dass zusätzlich zum bloßen Nachweis von „Hemmstoffen“, wie dies bereits seit langem in der Milchgüteverordnung geregelt ist, aus lebensmittelrechtlicher Sicht auch eine Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände erforderlich ist (SUHREN, 2002).

Voraussetzung für eine wirksame Kontrolle dieser Grenzwerte ist die Verfügbarkeit geeigneter Untersuchungsverfahren. Derzeit sind in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB zum Nachweis von Chinolon-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs HPLC-Methoden festgelegt. Diese Verfahren sind jedoch im Hinblick auf ihren apparativen, personellen und zeitlichen Aufwand für den Einsatz in der Routineanalytik nicht sehr praktikabel. Im Rahmen der Milchgüteverordnung sind der Brillantschwarz-Reduktionstest sowie der Blättchen-Test zur Überprüfung von Anlieferungsmilch auf Hemmstoffe vorgesehen. Diese Tests erfassen Chinolone jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen. Deswegen stellen die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen immunchemischen Verfahren bzw. der modifizierte Agardiffusionstest eine sinnvolle Ergänzung der bislang zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren dar.

4.1 Entwicklung enzymimmunologischer Nachweisverfahren

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war es, gruppenspezifische Antikörper gegen die Chinolon-Antibiotika herzustellen. Da niedermolekulare Substanzen als Haptene per se nicht immunogen wirken, müssen diese zur Herstellung wirksamer Immunogene an Trägerproteine gekoppelt werden. Bei der Selektion des zur Immunogenherstellung verwendeten Antigens bzw. der Auswahl eines geeigneten Kopplungsverfahrens worden folgende Überlegungen berücksichtigt. Bislang publizierte Ansätze zur Herstellung von Antikörpern gegen Chinolone legen den Schluss nahe, dass die Spezifität der generierten Antikörper im Wesentlichen von der Kopplungsstelle am Antigen bestimmt wird. Wurden zum Beispiel Chinolone wie Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Sarafloxacin oder Flumequin über die Carboxylgruppe an ein Trägerprotein gekoppelt, wurden von den immunisierten Tieren sehr substanzspezifische Antikörper gebildet, die nur geringe Kreuzreaktivitäten mit anderen Chinolonen aufwiesen (HAMMER und HEESCHEN, 1995; WATANABE et al., 2002; COILLIE et al., 2004; DUAN und YUAN, 2001; HOLTZAPPLE et al., 1997). Hingegen führte die Verwendung von Immunogenen, bei denen Chinolone über den am C7 substituierten Piperazinring an Proteine gekoppelt worden waren, zur Bildung von Antikörpern, die sich durch eine breitere Kreuzreaktivität auszeichneten (BUCKNALL et al., 2003; VERHEIJEN et al., 2003). Dementsprechend wurde in den eigenen Untersuchungen versucht, durch den Einsatz eines Ciprofloxacin-Derivates, nämlich Ciprofloxacin-Ethylendiamin, zu ähnlichen Ergebnissen zu kommen. Diese Substanz erlaubt bedingt durch die freie Aminogruppe an der Ethylendiamin-Seitenkette den Einsatz verschiedener Kopplungsvarianten. Als Trägerprotein diente KLH, zur Herstellung des Immunogens wurde die einstufige Glutaraldehyd-Methode verwendet. Mit dem so gewonnenen Konjugat wurden drei Kaninchen immunisiert, bei allen Tieren konnte eine spezifische Immunantwort induziert werden. Auf die prinzipiell gute Immunogenität von Chinolon-Protein-Konjugaten wurde auch von den anderen, oben aufgeführten Arbeitsgruppen hingewiesen.

Zum enzymimmunologischen Nachweis von Chinolonen wurden verschiedene EIA-Verfahren entwickelt, die alle auf dem kompetitiven Testprinzip basieren. Hierbei ist es ein gängiges Verfahren, durch den Einsatz heterologer Kopplungstechniken bei der Herstellung des enzymmarkierten Antigens die Nachweisempfindlichkeit der Testsysteme zu steigern

(VAN WEEMEN und SCHUURS, 1975; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985; USLEBER et al., 1994). Dieses Prinzip wurde auch in dieser Arbeit sowohl bei der Erstellung eines indirekten als auch bei der Etablierung des direkten kompetitiven EIA's berücksichtigt. So wurden für den Einsatz im direkten EIA Ciprofloxacin-Ethylendiamin und Clinafloxacin mit Hilfe der zweistufigen Natriumperjodatmethode nach WILSON und NAKANE (1978) an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Für den indirekten EIA wurden als Beschichtungsantigen zum einen ein Ciprofloxacin-Ethylendiamin-GlcOx-Konjugat hergestellt, zum anderen wurde Norfloxacin mittels der Carbodiimidmethode an Ovalbumin gekoppelt. Bei all diesen Konjugaten blieben die auch für die Wirksamkeit der Gyrase-Hemmer wichtigen funktionellen Gruppen (Oxo- bzw. Carboxylgruppe) an der Chinolon-Grundstruktur unverändert.

Die in den verschiedenen EIA-Varianten erreichten Nachweisgrenzen verdeutlichen die Bedeutung des heterologen Testprinzips. So konnten bei Einsatz des Ciprofloxacin-ED-HRP's bzw. von Ciprofloxacin-ED-GlcOx markierte Antigene, die zum Immunogen nur eine Brücken-Heterologie aufweisen (Perjodat-Kopplung anstelle der Glutaraldehyd-Kopplung) – in den entsprechenden EIA's 50 % Werte im Bereich von 16 - 19 ng/ml erreicht werden. Wurde hingegen ein anderes Hapten zur Herstellung des markierten Antigens verwendet (Norfloxacin-OVA bzw. Clinafloxacin-HRP), war eine deutliche Verbesserung der Sensitivität zu beobachten. Die 50%-Werte der so optimierten Verfahren lagen dann bei 5 - 6 ng Ciprofloxacin/ml, die Nachweisgrenzen bei 1,25 - 1,5 ng/ml. Vergleichbare Ergebnisse anderer Autoren liegen nicht vor, üblicherweise wurde sowohl für die Herstellung des Immunogens als auch des markierten Antigens die aktive Estermethode verwendet (COILLIE et al., 2004; WATANABE et al., 2002; DUAN und YUAN, 2001). Nur bei dem von BUCKNALL et al. (2003) beschriebenen EIA wurde ein heterologes Testprinzip realisiert. Hierbei wurde zur Immunogensynthese eine Carbodiimid-Methode eingesetzt, die Herstellung des Enzymkonjugates basierte auf einem aktiven Ester. Angaben, inwieweit dadurch die Testsensitivität verbessert wurde, sind der entsprechenden Publikation allerdings nicht zu entnehmen.

Neben der Sensitivität des Antiserums ist auch seine Spezifität von entscheidender Bedeutung. Die Spezifität des Antiserums bzw. der Antikörper wird vor allem durch die Präsentation des kovalent an das Trägerprotein gebundenen Haptens bestimmt.

Um im Gegensatz zu den meisten bislang publizierten Ansätzen die Gruppenspezifität der induzierten Antikörper zu gewährleisten, wurden zur Synthese des Immunogens bzw. der markierten Antigene funktionelle Gruppen an den substituierten Seitenketten verwendet. Damit wurde sichergestellt, dass die dieser Antibiotika-Gruppe gemeinsame Grundstruktur möglichst weit entfernt von der Kopplungsstelle lag und somit als besonders antigene Determinante fungieren konnte. Die fehlende Reaktivität der hergestellten Antikörper mit denjenigen Konjugaten, bei denen die an C₃ des Grundgerüsts angelagerte Carboxylgruppe zur Kopplung verwendet wurde, belegte, dass die Antikörper prinzipiell die gewünschte Spezifität aufwiesen.

Detailliertere Wettbewerbsversuche unter Verwendung der direkten EIA's, bei denen entweder Ciprofloxacin-ED-HRP bzw. Clinafloxacin-HRP als markiertes Antigen fungierte, ergaben, dass das verwendete Antiserum in beiden Systemen ein sehr ähnliches Spezifitätsmuster zeigte. Prinzipiell zeigte sich, dass Unterschiede im kopplungsnahen Bereich des Moleküls, wie beispielsweise unterschiedliche heterozyklische, ringförmige Substituenten an C₇, nur einen geringen Einfluss auf die Reaktivität des Antikörpers hatten. Hingegen reagierten vor allem die Chinolone in hohem Maße kreuz, die an der N₁-Position des Chinolin-Grundgerüsts einen Cyclopropylring besitzen. Ciprofloxacin, Danofloxacin, Enrofloxacin und Sparfloxacin zeigten Kreuzreaktionen von über 50 % im Bezug auf Ciprofloxacin. Clinafloxacin zeigte trotz eines Cyclopropylrings an der N₁-Position nur eine Kreuzreaktion von 10,6 % im direkten Testsystem unter Verwendung von Clinafloxacin-HRP. Dies könnte daran liegen, dass Clinafloxacin neben dem Cyclopropylring an der N₁-Position noch ein Chloratom an der C₈-Position besitzt. Die Bedeutung der Substituenten an C₈ und N₁ wird auch dadurch unterstrichen, dass die Antikörper zu Verbindungen wie Marbofloxacin und Flumequin, die sich durch eine zusätzliche Ringstruktur zwischen diesen beiden Atomen auszeichnen, nur mehr eine sehr geringe Affinität aufweisen (Kreuzreaktionen < 0,5 %). Chinolone, wie Norfloxacin und Oxolinsäure, bei denen der Cyclopropylring an der N₁-Position durch eine Ethylgruppe substituiert wurde, zeigten noch Kreuzreaktionen von über 10 % im direkten Testformat.

Die Überprüfung der Kreuzreaktionen im indirekten Testsystem unter Verwendung des Norfloxacin-Ovalbumin-Konjugats führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen außer dass Enrofloxacin in etwa gleich gut wie Ciprofloxacin reagierte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Antikörper eine breite Palette von Fluorchinolonen nachgewiesen werden kann. Mit den entwickelten EIA-Verfahren ist der sensitive Nachweis von den mit MRLs belegten Chinolonen wie Danofloxacin, Enrofloxacin, Oxolinsäure und dem Enrofloxacin-Metaboliten Ciprofloxacin möglich. Es konnten jedoch nicht alle Chinolone, die nach EWG-Verordnung 2377/90 mit Höchstmengen belegt sind, in ausreichender Empfindlichkeit erfasst werden (z.B. Marbofloxacin und Flumequin). Die von VERHEIJEN et al. (2003) beschriebenen Antikörper weisen für die mit einem MRL belegten Chinolone ein ähnliches Reaktivitätsmuster auf, obwohl ein völlig anderes Immunogen verwendet wurde. Der immunchemische Nachweis von Sarafloxacin und Difloxacin – Chinolone, die an N₁ einen Fluorbenzol-Substituenten aufweisen – ist bislang nur mit dem von HOLTZAPPLE et al. (1997) entwickelten Test möglich.

4.2 Modifizierter Agardiffusionstest

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte modifizierte Agardiffusionsverfahren eignet sich für den Nachweis von Chinolonen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Es zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. So liegt die Nachweisgrenze für Ciprofloxacin bei ca. 2 ng/ml, bei zehn weiteren wichtigen Chinolonen liegt die Nachweisgrenze unter 100 ng/ml. Prinzipiell ist es zudem möglich, durch Modifikationen des Testablaufs, wie z.B. Senkung des pH-Wertes, die Nachweisgrenzen noch weiter zu verbessern (KÜHNE, 1999). Gegenüber dem von SUHREN et al. (1996) beschriebenen Verfahren, bei dem das Nährmedium am Tag der Untersuchung hergestellt werden muss, konnte in eigenen Versuchen das fertige Nährmedium bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden. Auch eine Durchführung des Tests in Mikrotiterplatten ist vorstellbar, wodurch die Untersuchung einer weitaus größeren Anzahl an Proben ermöglicht wird. Ein weiterer Vorteil - neben der einfachen Durchführung - ist, dass die Proben in der Regel ohne aufwendige Vorbereitung untersucht werden können. Somit eignet sich der entwickelte modifizierte Agardiffusionstest als Screening-Verfahren für Chinolon-Rückstände, ersetzt aber Verfahren, die eine Identifizierung und genaue Quantifizierung des Wirkstoffes erlauben, nicht.

4.3 Untersuchung von Milch und Garnelen

Solange sichergestellt ist, dass die Antigen-Antikörperreaktionen und die Aktivität des Markerenzym durch die Probenmatrix nicht nachteilig beeinflusst werden, können mittels enzymimmunologischer Nachweisverfahren Proben ohne aufwendige Extraktions- und Aufbereitungsverfahren, wie sie für physikalisch-chemische Methoden notwendig sind, untersucht werden. So konnte in den eigenen Untersuchungen Milch nach Entfettung mittels Zentrifugation direkt in den EIA eingesetzt werden. Aufgrund der fehlenden Probenaufarbeitung konnten zudem hohe Wiederfindungsraten von durchschnittlich 92,3 % realisiert werden. HAMMER und HEESCHEN (1995), die einen indirekten EIA verwendeten, mussten hingegen eine umfangreiche Probenaufarbeitung (Entfettung, Proteinfällung mit 4% Oxalsäure, Zentrifugation, Neutralisation der Sauermolke mit Natronlauge sowie Zugabe von Tween 20[®]) einsetzen, um Rohmilchproben untersuchen zu können. Bei VERHEIJEN et al. (2003), sowie WATANABE et al. (2002) erwies es sich als ausreichend, die Milchproben entsprechend zu verdünnen. Die Einsetzbarkeit des EIA's wurde des Weiteren anhand von Milchproben einer mit Baytril[®] behandelten Kuh und eines mit Baytril[®] behandelten Kamels untersucht. Die über mehrere Tage gewonnenen Milchproben zeigten am ersten Tag einen hohen Gehalt von Ciprofloxacin-Äquivalenten, der bis zum fünften Tag stetig abnahm. Dies korreliert auch mit pharmakokinetischen Studien über die Ausscheidung der Chinolone (WIEDEMANN, 2002).

Die Anwendbarkeit des EIA's wurde auch bei festen Probenmaterialien demonstriert. Methanolische Rohextrakte von Garnelen konnten nach einem Verdünnungsschritt ohne weitere Probenaufarbeitung in den EIA eingesetzt werden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag bei 98,7 %, die Nachweisgrenze bei ca. 20 ng Ciprofloxacin pro g Probe. Ähnliche Extraktionsverfahren wurden auch in anderen EIA-basierten Experimenten eingesetzt, die in der Literatur beschriebenen Wiederfindungsraten für Chinolone in Lebensmitteln tierischen Ursprungs lagen zwischen 72 % und 132 % (DUAN und YUAN, 2001; HOLTZAPPLE et al., 1997; VERHEIJEN et al., 2003 und WATANABE et al., 2002).

Im Gegensatz zu den Berichten des KANTONALEN LABORATORIUMS BASEL-STADT (2002) und des KANTONALEN LABORS BASEL-LANDSCHAFT (2001) sowie des NATIONALEN RÜCKSTANDSKONTROLLPLANS (2004) konnten in den eigenen Untersuchungen in Garnelen-Proben aus dem Handel mittels EIA keine Chinolone nachgewiesen werden. Auch mit dem parallel dazu eingesetzten Agardiffusionstest, der ein anderes Spezifitätsmuster aufweist, wurden nur negative Ergebnisse erhalten. Da einige der gebräuchlichen Chinolone, wie z.B. Flumequin oder Difloxacin, mit beiden Verfahren nicht ausreichend sensitiv nachzuweisen sind, wurden die Proben auch noch mit einem am Institut neu entwickelten EIA untersucht, mit dem diese Substanzen sensitiv detektiert werden können (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch mit diesem Testverfahren konnten keine Chinolon-Rückstände in den Proben detektiert werden. Somit ergaben sich im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (SAITANU et al., 1994; BROWN und HIGUERA-CIAPARA, 1992) keine Hinweise darauf, dass Chinolon-Rückstände in der Aquakultur ein lebensmittelhygienisches Problem darstellen.

Mit den in dieser Arbeit entwickelten enzymimmunologischen Verfahren stehen Methoden zur Verfügung, mit denen bei guter Nachweisempfindlichkeit eine große Anzahl von Chinolonen in Lebensmitteln zuverlässig nachgewiesen werden können. Einfache Probenaufbereitungsverfahren erlauben zudem einen hohen Probendurchsatz. Um auch die einfache und schnelle Detektion weiterer Chinolone, wie Flumequin und Marbofloxacin, zu ermöglichen, wäre die Entwicklung weiterer Antikörper wünschenswert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von in der EU-weit geltenden Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 reglementierten Chinolonen. Zur Gewinnung gruppenspezifischer Antikörper wurde Ciprofloxacin-Ethylendiamin an Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) gekoppelt und drei Kaninchen intracutan immunisiert. Nach einer Restimulierung waren bei allen drei Kaninchen spezifische Antikörper nachweisbar.

Die zur Erstellung eines direkten und indirekten kompetitiven enzymimmunologischen Nachweisverfahrens notwendigen markierten Antigene wurden durch Kopplung von Ciprofloxacin, Ciprofloxacin-Ethylendiamin, Clinafloxacin sowie Norfloxacin an Meerrettichperoxidase, Glucoseoxidase oder Ovalbumin hergestellt. Dabei kamen verschiedene Kopplungsmethoden (aktive Estermethode, Perjodatmethode und Carbodiimidmethode) zum Einsatz.

Mit dem spezifischen Serum eines Tieres wurden verschiedene kompetitive Enzymimmuntests entwickelt. Von den direkten Enzymimmuntests wies das empfindlichste System eine Nachweisgrenze für Ciprofloxacin von 1,25 ng/ml auf, im indirekten Testsystem lag die untere Nachweisgrenze bei 1,5 ng/ml. Ciprofloxacin konnte somit weit unterhalb des geltenden MRL-Wertes von 100 µg/kg in Milch nachgewiesen werden. Das Antiserum zeigte nur bedingt Gruppenspezifität. Für fünf von 23 überprüften Chinolonen wurden Kreuzreaktionen von > 50 % ermittelt, von den mit einem MRL-Wert belegten Substanzen wurden Danofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Oxolinsäure erfasst.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der entwickelten Testsysteme wurden künstlich kontaminierte und gewachsene Milch- und Garnelenproben untersucht, wobei das jeweilige Testsystem an die entsprechende Probenmatrix adaptiert wurde. Die mittlere Wiederfindungsrate lag bei 95,5 %, in keiner der Praxisproben konnten Chinolonrückstände nachgewiesen werden. Weiterhin wurde ein mikrobiologisches Verfahren unter Verwendung von *E. coli* als Testkeim zum Nachweis für Chinolone entwickelt. Dieser Agardiffusionstest zeichnete sich durch eine hohe Sensitivität und Gruppenspezifität aus. Ciprofloxacin konnte mit einer Nachweisgrenze von 2 ng/ml weit unterhalb des geltenden MRLs nachgewiesen werden, zehn weitere wichtige Chinolone wurden unterhalb von 100 ng/ml erfasst. Dieses System kann somit als nützlicher Kontrolltest verwendet werden.

SUMMARY

Development and characterization of enzyme immunoassays for the detection of quinolones

This paper describes the development of enzyme immunoassays for the group specific detection of quinolones which are regulated by the Council Regulation (EEC) No. 2377/90. For the production of group specific antibodies ciprofloxacin-ethylendiamin was conjugated to keyhole limpet haemocyanin (KLH) and used for the intradermal immunisation of three rabbits. After a reimmunisation step, specific antibodies were detected in all three rabbits.

In order to prepare labelled antigens applicable as conjugates in direct and indirect competitive enzyme immunoassays, ciprofloxacin, ciprofloxacin-ethylendiamin and clinafloxacin were linked to horseradish peroxidase, glucoseoxidase and ovalbumin. This was achieved by using several coupling methods (carbodiimide, active ester and periodate method).

Several variations of competitive enzyme immunoassays were developed using the specific antiserum of one animal. Under the direct competitive EIAs tested, the most sensitive assay showed a detection limit of 1.25 ng/ml for ciprofloxacin. Using an indirect competitive assay format the detection limit was at 1.5 ng/ml. Thus, ciprofloxacin could be detected far below the respective MRL of 100 µg/ml in milk. The antiserum showed only limited group-specificity for quinolones. Five out of 23 quinolones tested showed cross-reactivities above 50 %, including quinolones with MRL like danofloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, and oxolinic acid.

To test the applicability of the established test systems, artificial contaminated and incurred milk and shrimp samples were tested. For this purpose, each system was adapted to the respective sample matrix. The mean recovery was 95.5 %. Analyzing 47 milk samples and 37 shrimp samples quinolone residues were not detected. Furthermore, a microbiological method using *E. coli* as test organism was developed which allowed the detection of eleven important quinolones below 100 ng/ml. This agar diffusion test can be used as a suitable control test.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ANADÓN, A., M. R. MARTINEZ-LARRAÑAGA, M. J. DIAZ, P. BRINGAS, M. A. MARTINEZ, M. L. FERNÁNDEZ-CRUZ, M. C. FERNÁNDEZ und R. FERNÁNDEZ (1995):
Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens
Am. J. Vet. Res. 56, 501-506

ANDERSON, G. W., J. E. ZIMMERMANN und F. M. CALLAHAN (1964):
The use of esters of N-Hydroxysuccinimide in peptide synthesis
J. Am. Chem. Soc. 86, 1839-1842

APPELBAUM, P. C. und P. A. HUNTER (2000):
The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives
Int. J. Antimicrob. Agents 16, 5-15

AVRAMEAS, S. (1969):
Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde
Immunochem. 6, 43-52

BEM, J. L. und R. D. MANN (1988):
Danger of interaction between ciprofloxacin and theophylline
Br. Med. J. 296, 1131

BOWLES, S. K., Z. POPOVSKI, M. J. RYBAK, H. B. BECKMAN und
D. J. EDWARDS (1988):
Effect of norfloxacin on theophylline pharmacokinetics at steady state
Antimicrob. Agents Chemother. 32, 510-512

BRENWALD, N. P., M. J. GILL und R. WISE (1998):
Prevalence of a Putative Efflux Mechanism among Fluoroquinolone-Resistant Clinical
Isolates of *Streptococcus pneumoniae*
Antimicrob. Agents Chemother. 42, 2032-2035.

BROWN, J. H. und I. HIGUERA-CIAPARA (1992):

Antibiotic residues in farmed shrimp: A developing problem?

In: Chemotherapy in Aquaculture: From theory to reality (Hrsg.): XIII International Symposium of épizooties. 12.-15. März,

International office of Epizootics, Paris, France pp. 394-403

BUCKNALL, S., J. SILVERLIGHT, N. COLDHAM, L. THRONE und R. JACKMAN (2003):

Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products

Food Addit. Contam. 20, 221-228

CARLSSON, A. und L. BJÖRCK (1987):

The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus sterothermophilus* var. *calidolactis*.

Milchwiss. 42, 282-285

CHARM SCIENCES INC., Malden/USA (o. J. a):

Charm II Test for beta-lactams in milk using tablet reagents (Operators Manual)

Produktinformation

CHRIST, W. (1998):

Nutzen/Risiko-Abwägung: Gyrasehemmer (Fluorchinolone) -Spezifische toxikologische Aspekte und Nebenwirkungen.

In: OTT, T., F.-W. HEFEDEHL und P. GROSDANOFF (Hrsg.):

Arzneimittel und Medizinprodukte, Bewertung - Verfahren – Perspektiven, pp. 87-96

BfArM, Berlin

COILLIE, E. V., J. D. BLOCK und W. REYBROECK (2004):

Development of an Indirect Competitive ELISA for Flumequine Residues in Raw Milk Using Chicken Egg Yolk Antibodies

J. Agric. Food Chem. 52, 4975-4978

- DALSGAARD, A., H. H. HUSS, A. H.-KITTIKUN und J. L. LARSEN (1995):
Prevalence of *Vibrio cholerae* and Salmonella in major shrimp production area in Thailand
Int. J. Food Microbiology 28, 101-113
- DUAN, J. und Z. YUAN (2001):
Development of an Indirect Competitive ELISA for Ciprofloxacin Residues in Food Animal
Edible Tissues
J. Agric. Food Chem. 49, 1087-1089
- EDWARDS, R. G., D. A. SPACKMAN und J. M. DEWDNEY (1982):
Development and Use of Three New Radioallergosorbent Tests in the Diagnosis of Penicillin
Allergy
Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 68, 352-357
- EKINS, R. P. (1985):
Current concepts and future developments.
In: COLLINS, W. P. (Hrsg.): Alternative Immunoassays, pp. 219-237
Wiley, Chichester u.a.
- FAO/ NACA/ WHO (1999):
Food safety issues associated with products from aquaculture
FAO technical report series 883, Geneva
- FREY, H.-H. und W. LÖSCHER (2002):
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Kap.14 pp. 389-393
Enke Verlag, Stuttgart
- FUHR, U., E.-M. ANDERS, G. MAHR, F. SORGEL, und A. H. STAIB (1992):
Inhibitory Potency of Quinolone Antibacterial Agents against Cytochrome P450IA2 Activity
In Vivo and In Vitro
Antimicrob. Agents Chemother. 36, 942-948

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Teramethylbenzidin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GORLA, N., E. CHIOSTRI, L. UGNIA, A. WEYERS, N. GIACOMELLI, R. DAVICINO und H. GARCÍA OVANDO (1997):

HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens
Int. J. Antimicrob. Agents 8, 253-256

GOSS, W. A., W. H. DIETZ und T. M. COOK (1964):

Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 88, 1112-1120

GROHE, K. (1998):

The Chemistry of the Quinolones: Methods of Synthesizing the Quinolone Ring System
In: KUHLMANN, J., A. DALHOFF und H.-J. ZEILER (Hrsg.):
Quinolone antibacterials; pp.13-62
Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg,

HAMMER, P. und W. HEESCEN (1995):

Antibody-capture immunoassay for the detection of enrofloxacin in raw milk
Milchwissenschaft 50 (9), 513-514

HAWKEY, P. M. (2003):

Mechanisms of quinolone action and microbial response
J. Antimicrob. Chemother. 51, 29-35

HERBERT, G. A., P. L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammoniumsulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera
Appl. Microbiol. 25, 26-36

HERMANSON, G. T. (1996):

Bioconjugate Techniques, Enzyme Modification and Conjugation, pp. 630-632

Academic Press, San Diego

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A., R. COMPAÑÓ und M. D. PRAT (2000):

Multiresidue Analysis of Fluoroquinolones in animal Tissues

In: van GINKEL, L. A. und A. RUITER (Hrsg.): Euroresidue IV: conference on residue of veterinary drugs in food, 8-10 May, 2000, pp. 558-562

RIVM, Bilthoven

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A., J. BARBOSA, R. COMPAÑÓ und M. D. PRAT (2002):

Analysis of quinolone residues in edible animal products

J. Chromatogr. A 945, 1-24

HOLSTRÖM, K., S. GRÄSLUND, A. WAHLSTRÖM, S. PONGSHOMPOO., B. E.

BENGTSSON und N. KAUTSKY (2003):

Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health

Int. J. Food Sci. Tech. 38, 255–266

HOLTZAPPLE, C. K., S. A. BUCKLEY und L. H. STANKER (1997):

Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Sarafloxacin and Cross-Reactivity Studies of Related Fluoroquinolones

J. Agric. Food Chem. 45, 1984-1990

HOLTZAPPLE, C. K., S. A. BUCKLEY und L. H. STANKER (2001):

Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography

J. Chromatogr. B 754, 1-9

HOLZGRABE, U. (2004):

Antibiotika-Entwicklung gestern und heute

Chemother. J. 13, 142-147

HORIE, M., K. SAITO, Y. HOSHINO, N. NOSE, H. NAKAZAWA und Y. YAMANE (1991):

Simultaneous determination of residual synthetic antibacterials in fish by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. 538, 484-491

IKAI, Y., H. OKA, N. KAWAMURA, M. YAMADA, K. HARADA, M. SUZUKI und H. NAKAZAWA (1989):

Simple and rapid determination of residual pyridonecarboxylic acid antibacterials in fish using a prepacked amino cartridge

J. Chromatogr. 477, 397-406

INTORRE, L., S. CECCHINI, S. BERTINI, A. M. COGNETTI VARRIALE, G. SOLDANI und G. MENGOZZI (2000):

Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*)

Aquaculture 182, 49-59

JUHEL-GAUGAIN, M., und J. P. ABJEAN (1998):

Screening of Quinolone Residues in Pig Muscle by Planar Chromatography

Chromatographia 47, 101-104

KANTONALES LABORATORIUM BASEL-STADT (2002)

3.1.1 Geflügel aus China

Jahresbericht 2002, pp. 28-32

http://www.kantonslabor-bs.ch/infos_berichte.cfm?

KANTONALES LABOR BASEL-LANDSCHAFT (2001):

Untersuchung von *Salmoniden* auf Tierarzneimittel-Rückstände

Jahresbericht 2001,

http://www.baselland.ch/docs/vsd/labor/aktuell/jb2001/2_fleisch_fisch.htm

KITAGAWA, T., T. SHIMOZONO, T. AIKAWA, T. YOSHIDA und H. NISHIMURA (1981):
Preparation and characterization of hetero-bifunctional crosslinking reagents for protein
modifications

Chem. Pharm. Bull. 29, 1130-1135

KÜHNE, M. (1999):

Verbesserter mikrobiologischer Nachweis von Enrofloxacin und Ciprofloxacin

In: 40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht pp. 469-472

KRESKEN, M., D. HAFNER, F. J. SCHMITZ, T. und A. WICHELHAUS (2003):

Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in
Deutschland und im mitteleuropäischen Raum.

Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Bonn

LEHN, N., H.-J. LINDE und P. HEISIG (2002):

Fluorchinolone: Mechanismen der Resistenzentwicklung

Chemother. J. 11, Suppl. 20, 15-17

LEFEBVRE, H. P., M. SCHNEIDER, V. DUPOUY, V. LARIÒUTE, G. COSTES, L.
DELESALLE und P.L. TOUTAIN (1998):

Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites
in the dog

J. vet. Pharmacol. Therap. 21, 453-461

LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER (2002):

Pharmakotherapie bei Haus und Nutztieren, Kap. N pp. 242-244

Parey Verlag, Berlin

LUNESTAD, B.T., O. B. SAMUELSEN, S. FJELDE und A. ERVIK (1995):

Photostability of eight antibacterial agents in seawater

Aquaculture 134, 217-225

MÄRTLBAUER, E. (1988):

Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen
(Aflatoxine, Ochratoxin A und Trichothecene) in Lebensmitteln

Diss. med. vet., München

MÄRTLBAUER, E. (1993):

Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe

Enke Verlag, Stuttgart

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):

Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in
Milch und Milchpulver

Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53-55

MEYER-BURGMAYER, M. (1980):

Zur Frage unspezifischer Reaktionen bei der Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe

Diss. med. vet., München

MUNNS, R. K., S. B. TURNISPEED, A. P. PFENNING, J. E. ROYBAL, D. C. HOLLAND
und A. R. LONG (1998):

Liquid Chromatographic Determination of Flumequine, Nalidixic Acid, Oxolinic Acid and
Piromidic Acid Residues in Catfish (*Ictalurus punctatus*)

J. AOAC Int. 81, 825-838

MUNNS, R. K., S. B. TURNISPEED, A. P. PFENNING, J. E. ROYBAL, D. C. HOLLAND,
A. R. LONG und S. M. PALKAS (1995):

Determination of Residues of Flumequine and Nalidixic, Oxolinic, and Piromidic Acids in
Catfish by Liquid Chromatography with Fluorescence and UV Detection

J. AOAC Int. 78, 343-352

NABER, K. und D. ADAM (1998):

Einteilung der Fluorchinolone

Münch. Med. Wschr. 140, 248-250

NATIONALER RÜCKSTANDSKONTROLLPLAN (2004):

Jahresbericht 2004 zum Nationalen Rückstandskontrollplan

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_493680/DE/01_Lebensmittel/01_Sicherheit_Kontrollen/04_NRKP/01_berichte_nrkp/nrkp_bericht_2004.html

NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):

Production of antisera in rabbits

In: CAMERON, E. D. H., S. G. HILLER und K. GRIFFITH (Hrsg.):

Steroid Immunoassays Proceedings of the 5th Tenovus Workshop, pp. 87-96

Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales

Paul-Ehrlich-Gesellschaft (1998):

Einteilung der Fluorchinolone

Chemother. J. 7(1), 16-26

PALMADA, J. R. MARCH, E. TORROELA, C. ESPIGOL und T. BALERI (2000):

Determination of enrofloxacin and its active metabolite (ciprofloxacin) at the residue level in broiler muscle using HPLC with fluorescence detection

In: van GINKEL, L. A. und A. RUITER (Hrsg.): Euroresidue IV: conference on residue of veterinary

drugs in food, 8-10 May, 2000, pp. 822-826

RIVM, Bilthoven

PETERSEN, U. (2001):

Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation

Pharmazie in unserer Zeit 5, 376-381

PFENNING, A. P., R. K., MUNNS, S. B. TURNISPEED, J. E. ROYBAL, D. C. HOLLAND und A. R. LONG (1996):

Determination and Confirmation of Identities of Flumequine and Nalidixic, Oxolinic and Piromidic Acids in Salmon and Shrimp

J. AOAC Int. 79, 1227-1235

PLAKAS, S. M., K. R. EL SAID, S. M. MUSSER (2000):

Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of flumequine in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)
Aquaculture 187, 1-14

QUANDT, B. (2006):

Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch mittels Schnelltestsyste-men
Diss. med. vet., München

RENAU, T. E., R. LÉGER, E. M. FLAMME, J. SANGALANG, M. W. SHE, R. YEN, C. L. GANNON, D. GRIFFITH, S. CHAMBERLAND, O. LOMOVSKAYA, S. J. HECKER, V. J. LEE, T. OHTA und K. NAKAYAMA (1999):

Inhibitors of Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Potentiate the Activity of the Fluorquinolone Antibacterial Levofloxacin
J. Med. Chem. 42, 4928-4931

REYBROECK, W. und S. OOGHE (2002):

Results of a multilaboratory trial regarding rapid tests for the control of milk on β -lactam antibiotics

In: 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis (Hrsg.):
4.-7. Juni 2002, Antwerpen (Belgien)

RODLOFF, A. C., C. ECKHARDT und B. PLEß (1999):

Bedeutung der lokalen Resistenzsituation

Chemother. J. 8 Suppl. 18, 11-18

SAITANU, K., A. ALONGKORN, F. KONDO und C. E. TSAI (1994):

Antibiotic residues in tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Asian Fish. Soc. 7, 47-52

SAITANU, K., H. KOBAYASHI, T. CHALERMCHAIKIT und F. KONDO (1996):

Simple and Rapid Method for Determination of Oxolinic Acid in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) by High-Performance Liquid Chromatography.

J. Food Prot. 59, 199-201

SCHNEIDER, M. J. und D. J. DONOGHUE (2004):

Comparison of a Bioassay and a Liquid Chromatography-Fluorescence-Mass Spectrometry Method for Detection of Incurred Enrofloxacin Residues in Chicken Tissues
Poultry Science 83, 830-834

SCHNEIDER, M., V. THOMAS, B. BOISRAME und J. DELEFOGE (1996):

Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration
J. vet. Pharmacol. Therap. 19, 56-61

SEHN, L. L. und D. T. W. CHU (1996):

Typ II DNA Topoisomerase as Antibacterial Targets.
Curr. Pharm. Des. 2, 195-208

SEHN, L. L., S. K. TANAKA und D. W. T. CHU (1997):

Quinolones, 2-Pyridones and Resistant Type II DNA Topoisomereses
Curr. Pharm. Des. 3, 169-176

SEHN, L. L., L. A. MITSCHER, P. N. SHARMA, T. J. O'DONNELL, D. W. T. CHU, C. S. COOPER, T. ROSEN und A. G. PERNET (1989):

Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: A Cooperative Drug-DNA Binding Model
Biochem. 28, 3886-3894

SÖRGEL, F. (1989):

Metabolism of gyrase inhibitors
Rev. Infect. Dis. 11, 1119-1129

SÖRGEL, F., J. BULITTA und M. KIZING-SCHIPPERS (2002):

Pharmakokinetik der Chinolone
Chemother. J. 11 Suppl. 20, 25-33

SÖRGEL, F., M. KINZIG-SCHIPPERS, L. HÜBNER und G. RÜSING (1996):
Aktuelle pharmakokinetische Aspekte der Gyrasehemmer - Beziehung der Kinetik zur
Struktur und physikalisch-chemischen Eigenschaften
In: PAUL EHRLICH GESELLSCHAFT/ LODE H., W. STILLE, (Hrsg.):
Sparfloxacin bei der Behandlung von ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen -
Grundlagen und Standortbestimmungen, pp. 81-101
Futuramed Verlag, München

STAHLMANN, R. (1999):
Unerwünschte Wirkung der Fluorchinolone
Chemother. J. 8 Suppl. 18, 47-52

STEIN, G. E. (1988):
The 4-Quinolone Antibiotics: Past, Present and Future
Pharmacotherapy 8, 301-314

STERMITZ, F. R., P. LORENZ, J. N. TAWARA, L. A. ZENEWICZ and K. LEWIS (2000):
Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-
methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor
PNAS 97, 1433-1437

STERNESJÖ, Å., C. MELLGREN und L. BJÖRCK (1996):
Application of an Immunosensor technique for Determination of Enrofloxacin in Milk from
Baytril® treated Cows
In: HAAGSMA, N. und A. RUITER (Hrsg.): Euroresidue III: conference on residues of
veterinary drugs in food, 6-8 May, 1996, pp. 890-894
RIVM, Bilthoven

STROH, K. (2002):
Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Lebensmitteln und Umwelt
in: Fachinformation „Umwelt und Gesundheit“
http://www.bayern.de/lfu/umwberat/data/archiv/antibiot_2002.htm

SUHREN, G. (1997):

Mikrobiologischer Hemmstofftest mit *E. coli* zum Nachweis von Chinolon-Rückständen in Milch

In: 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht pp. 659-664

SUHREN, G. (2002):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch – rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 54, 35-69

SUHREN, G., P. HAMMER und W. HEESCHEN (1996):

Detection of residues of quinolones in milk

In: HAAGSMA, N. und A. RUITER (Hrsg.): Euroresidue III: conference on residues of veterinary drugs in food, 6-8 May, 1996, pp. 917-921
RIVM, Bilthoven

TAKATSUKI, K. (1991):

Gas chromatographic-mass spectrometric determination of oxolinic acid in fish using selected ion monitoring

J. Chromatogr. 538, 259-267

TAO, S. H. und M. POUMEYROL (1989):

Méthode rapide d'identification de la flumequine dans la chair des truites
Rev. Med. Vet. 140, 321-323

USLEBER, E., M. LORBER, M. STRAKA, G. TERPLAN und E. MÄRTLBAUER (1994):

Enzyme immunoassay for the Detection of Isoxazolyl Penicillin Antibiotics in Milk
Analyst 119, 2765-2768

VAN WEEMEN, B. K. und A. H. W. M. SCHUURS (1975):

The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogene on the characteristics of estrogene enzyme-immunoassays

Immunochem. 12, 667-670

VEGA, M., G. RIOS, R SAELZER und E. HERLITZ (1995):

Analysis of Quinolonic Antibiotics by HPTLC. Oxolinic Acid Residue Analysis in Fish Tissue

J. Planar Chromatogr. 8, 378-381

VERHEIJEN R., N. SAJIC, I. HOPMAN und C. J. M. ARTS (2003):

Detection of fluoroquinolones by enzyme immunoassay in biological matrices

Abstracts des VIIth Int. Conference on Agri-Food Antibodies, 11-13 September

Uppsala, Sweden

VOLMER, D. A., B MANSOORI und S. J. LOCKE (1997):

Study of 4-Quinolone Antibiotics in Biological Samples by Short-Column Liquid

Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Anal. Chem. 69, 4143-4155

WATANABE H., A. SATAKE, Y. KIDO und A. TSUJI (2002):

Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices

Analyst 127, 98-103

WIEDEMANN, B. (1999):

Pharmakodynamik: Modell und Realität

Chemother. J. 8 Suppl. 18, 28-32

WIEDEMANN, B. (2002):

Pharmakodynamik der Chinolone im Vergleich

Chemother. J. Suppl. 20, 34-38

WIEDEMANN, B. und P. HEISIG (1999):

Bakterielle Resistenzen gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin)

Chemother. J. 8, 99-108

WILSON. M. B. und P. K. NAKANE (1978):

Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies

In: KNAPP, w., HOLUBAR und G. WICK (Hrsg.): Immunofluorescence and related staining techniques, pp. 215-224

Elsevier, Amsterdam u. a.

WONG, S. S. (1993):

Chemistry of protein conjugation and cross-linking, p. 23-25

CRC Press, Boca Raton

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die allzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. A. Urabl (geb. Strasser) für die hervorragende Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die Sorgfalt bei der Durchsicht der Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Dietrich bedanken für die geduldige und humorvolle Hilfe und die Sorgfalt bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Eva Bachmeier-Köck und Herrn Mostefa Djefal, sei an dieser Stelle ganz herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche und geduldige Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit gedankt.

Ich danke vielmals meiner ganzen Familie für die Geduld, Motivation und Unterstützung.

Von ganzem Herzen danke ich Lena für ihren Zuspruch, ihre Geduld und ihre Aufmunterungsversuche.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Großmutter Frau Magarette Seipel für die finanzielle Unterstützung, die es mir erst ermöglicht hat, diese Arbeit anzufertigen.

Lebenslauf

Andreas Gärtner	Geboren am 09. Juni 1977 in Erfurt
Eltern:	Helga Gärtner, geb. Seipel Dr. Helmut Gärtner
Schulbildung:	1984-1990 Polytechnische Oberschule IV Bad Langensalza 1990-1996 Salza-Gymnasium Bad Langensalza
Zivildienst:	1996-1997 Zivildienst in der Kirchgemeinde Bad Langensalza
Studium:	1997-2003 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig
Staatsexamen:	18. Juli 2003
Approbation:	13. August 2003
Berufliche Tätigkeit:	Seit März 2004 Doktorand am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der LMU München