

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

**Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden
in Milch - Herstellung der immunchemischen Komponenten**

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

von

Angelika Christine Strasser

aus
München

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Förster

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

*Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Tierarzneimittel-Rückstände in der Milch	3
2.1.1	Allgemeines.....	3
2.1.2	Gesundheitliche und technologische Risiken.....	3
2.1.3	Rechtliche Grundlagen.....	5
2.2	Charakteristika einiger Antiinfektiva	8
2.2.1	Penicilline	8
2.2.1.1	Geschichte.....	8
2.2.1.2	Struktur und Synthese.....	8
2.2.1.3	Wirkungsprinzip.....	9
2.2.1.4	Wirkungsspektrum.....	10
2.2.1.5	Resistenzentwicklung.....	10
2.2.2	Streptomycin und Dihydrostreptomycin	11
2.2.2.1	Geschichte.....	11
2.2.2.2	Struktur und Synthese.....	11
2.2.2.3	Wirkungsprinzip.....	12
2.2.2.4	Wirkungsspektrum.....	13
2.2.2.5	Resistenzentwicklung.....	13

2.2.3	Sulfonamide	14
2.2.3.1	Geschichte.....	14
2.2.3.2	Struktur und Synthese.....	14
2.2.3.3	Wirkungsprinzip.....	15
2.2.3.4	Wirkungsspektrum.....	16
2.2.3.5	Resistenzentwicklung.....	16
2.3	Nachweisverfahren für Tierarzneimittel-Rückstände in Milch	17
2.3.1	Allgemeines	17
2.3.2	Mikrobiologische Hemmstofftests	18
2.3.2.1	Allgemeines.....	18
2.3.2.2	Amtliche Untersuchungsmethodik.....	18
2.3.2.3	Kommerzielle Hemmstofftestsysteme.....	19
2.3.3	Physikalisch-chemische Verfahren	20
2.3.3.1	Allgemeines.....	20
2.3.3.3	Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie.....	21
2.3.3.2	Nachweis mittels Gaschromatographie.....	21
2.3.3.4	Nachweis mittels Flüssigkeitschromatographie.....	22
2.3.4	Klassische immunologische Verfahren und Rezeptorschnelltests	26
2.3.4.1	Allgemeines.....	26
2.3.4.2	Enzymimmunoassays.....	28
2.3.4.3	Kommerzielle Schnelltestsysteme.....	28
2.3.5	Nachweisverfahren mittels Biosensortechnik	32
2.3.5.1	Allgemeines.....	32
2.3.5.2	Funktionsprinzipien einiger Biosensor-Systeme.....	32

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1	Materialien und Geräte	36
3.1.1	Chemikalien und Biochemika.....	36
3.1.2	Antibiotika und Sulfonamide.....	37
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	39
3.1.4	Immunreagenzien.....	39
3.1.5	Probenmaterial.....	40
3.1.6	Geräte.....	40
3.1.7	Sonstige Materialien.....	40
3.2	Untersuchungen und Ergebnisse	41
3.2.1	Entwicklung eines verbesserten gruppenspezifischen Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillinen	41
3.2.1.1	Etablierung eines direkten kompetitiven Enzymimmuntests.....	41
3.2.1.1.1	Bestimmung der Sensitivität.....	42
3.2.1.1.2	Bestimmung der Spezifität.....	43
3.2.1.2	Charakteristika des entwickelten gruppenspezifischen Enzymimmuntests.....	43
3.2.1.3	Anwendbarkeit des Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillinen.....	46
3.2.2	Entwicklung indirekter Enzymimmunoassays zum Nachweis einiger Antiinfektiva	50
3.2.2.1	Herstellung der Festphasenantigene.....	50
3.2.2.1.1	Derivatisierungen.....	51
3.2.2.1.2	Kopplungsverfahren.....	54
3.2.2.1.3	Kopplungsansätze.....	61

3.2.2.2	Etablierung indirekter kompetitiver Enzymimmuntests zum Einzelnachweis einiger Antibiotika und Sulfonamide.....	63
3.2.2.2.1	Prinzip indirekter kompetitiver Enzymimmuntests.....	63
3.2.2.2.2	Bestimmung der Sensitivität für die einzelnen Testsysteme.....	63
3.2.2.2.3	Bestimmung der Spezifität der einzelnen Testsysteme.....	64
3.2.2.2.4	Charakteristika der optimierten Verfahren.....	64
3.2.2.3	Entwicklung eines semiquantitativen Multianalyt-Schnelltests.....	79
3.2.3	Anwendung der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden.....	85
3.2.3.1	Untersuchung Hemmstoff-positiver Praxisproben.....	85
3.2.3.2	Nachweis von Antiinfektiva mittels Biosensor unter Verwendung eines Antigen-Microarrays.....	88
4	DISKUSSION.....	93
4.1	Direkter Enzymimmuntest zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen.....	93
4.2	Etablierung indirekter enzymimmunologischer Testsysteme.....	94
4.2.1	Nachweis von Penicillinen.....	96
4.2.2	Nachweis von Streptomycin.....	99
4.2.3	Nachweis von Sulfonamiden.....	100

4.3	Anwendung der Enzymimmunoassays.....	103
4.3.1	Untersuchung künstlich kontaminierter Milch und Hemmstoff-positiver Praxisproben.....	103
4.3.2	Simultaner Nachweis der Antiinfektiva auf der Mikrotiterplatte und mittels Biosensor.....	104
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	106
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	108

Abkürzungsverzeichnis

BSA: Bovines Serumalbumin

DCC: Dicyclohexylcarbodiimid

EDPC: 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid

ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, Enzymimmunoassay

GlcOx: Glukoseoxidase

HRP: Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase

HS: Hemisuccinat

IE: Internationale Einheiten

KR: Kreuzreaktion

LW: Leerwert

MG: Molekulargewicht

MPR: Milchprüfring

MRL: Maximum Residue Limit, Höchstwert

OVA: Ovalbumin

PBS: phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Pen G: Penicillin G

PJ: Perjodat

SDA: Sulfadiazin

SMA: Sulfamethazin

S: Standardabweichung

TMB: Tetramethylbenzidin

VK: Variationskoeffizient

In der Prophylaxe und Therapie von (Euter-)Infektionen bei Milchkühen haben Antibiotika und Sulfonamide noch immer eine große Bedeutung. Trotz gesetzlicher Vorschriften und Überwachungsmethoden kommt es immer wieder zu Rückständen antimikrobieller Substanzen in Milch, die hohe wirtschaftliche Verluste in der Milch- und Lebensmittelindustrie nach sich ziehen und ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darstellen. Die laut Milch-Güteverordnung vorgeschriebene Untersuchung auf Hemmstoffe einerseits und die aufgrund lebensmittelrechtlicher Vorschriften erforderliche Prüfung auf Tierarzneimittel-Rückstände (Antiinfektiva) andererseits dienen zwei unterschiedlichen Zwecken: erstere soll eine Information über die Qualität der Anlieferungsmilch vermitteln, letztere hingegen soll die Einhaltung der in der VO (EWG) Nr. 2377/90 für Milch festgesetzten Höchstmengen (MRLs) und damit den Schutz des Verbrauchers sicherstellen. Für beide Zielsetzungen finden vorwiegend die einfach und kostengünstig durchzuführenden mikrobiologischen Methoden Anwendung; bei Untersuchungen auf Tierarzneimittelrückstände sind allerdings zusätzlich geeignete Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung des im mikrobiologischen Suchverfahren nachgewiesenen Wirkstoffes erforderlich (z.B. Gruppen-/ Substanz-spezifische Tests, Bestätigungstests).

Wenn auch derzeit davon ausgegangen werden kann, dass die überwiegende Mehrzahl Hemmstoff-positiver Ergebnisse in Milch auf Rückstände von β -Laktamantibiotika (Penicilline und Cephalosporine) zurückzuführen ist, können aus rechtlicher und technologischer Sicht andere Antibiotika- und Sulfonamidrückstände nicht außer acht gelassen werden. Idealerweise sollte deshalb die Kontrolle möglichst viele Arzneimittelrückstände erfassen und bereits beim Erzeuger - vor der Übernahme der Milch in den Sammelwagen - durchgeführt werden. Voraussetzung für diese unter allen Aspekten vorteilhafte Vorverlagerung der Untersuchung auf die Erzeugerebene ist die "on-line"-Erfassung von Antibiotika- und Sulfonamidrückständen.

Zur Verwirklichung dieser Idealvorstellung wurde im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojektes mit der TU München ein Biosensor-System entwickelt, das in Zukunft den automatisierten und parallelen Schnelldachweis von verschiedenen Antiinfektiva in Milch

ermöglichen sollte. Prinzipiell basiert der Sensor auf der Kombination eines klassischen indirekten kompetitiven Enzymimmunoassays mit moderner Microarray-Technologie und vereint damit die Vorteile beider Verfahren, wie das Potential zur Multianalytfähigkeit, Automatisierbarkeit, Miniaturisierung und Reduzierung der Testzeiten. Die Entwicklung der dazu essentiellen biologischen Komponenten war Ziel der vorliegenden Arbeit, wobei hinsichtlich des später zu erfolgenden Transfers der einzelnen Tests von der Mikrotiterplatte auf den Biochip die Entwicklung einer breiten Palette robuster Immunreagenzien sowie deren intensive Charakterisierung notwendig war.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert; Projektnummer: 32 ZN

2 SCHRIFFTUM

2.1 Tierarzneimittel-Rückstände in der Milch

2.1.1 Allgemeines

Die größte Bedeutung unter den in Milch vorkommenden Hemmstoffen kommt den Rückständen von Tierarzneimitteln zu, wobei neben den β -Laktamantibiotika, die vorwiegend in der Therapie von subklinischen und subakuten Mastitiden eine Rolle spielen, auch andere Chemotherapeutika, meist Kombinationspräparate oder Breitbandantibiotika, angewendet werden. Die intramammäre Applikation ist als häufigste Kontaminationsquelle für Milch anzusehen (SCHÄLLIBAUM, 1990; MPR BAYERN e.V., 2000), gefolgt von intramuskulärer und intrauteriner Applikation (OLIVER et al., 1990). Die Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchungen aus der Tätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. (Tätigkeitsbericht MPR 1999 und 2000) zeigten, dass Penicilline nach wie vor den größten Anteil hemmstoffpositiver Anlieferungsmilch ausmachen. Von 1764 im Jahr 1999 positiv getesteten Milchproben - das entspricht 0,06 % der untersuchten Proben - durch den MPR waren 93,6 % auf Penicilline zurückzuführen.

2.1.2 Gesundheitliche und technologische Risiken

Die gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers durch Rückstände von Tierarzneimitteln besteht in erster Linie in der Auslösung von Allergien und in der Gefahr der Resistenzbildung humanpathogener Erreger. Die Bedeutung der Aufnahme von Antibiotika- und Sulfonamiden durch belastete Lebensmittel liegt vor allem darin, dass bei bereits sensibilisierten Personen sehr niedrige Wirkstoffkonzentrationen zu einer allergischen Reaktion führen können (DEWDNEY et al., 1991; CRIBB und SPIELBERG, 1992), während eine de-novo-Sensibilisierung durch die niedrigen Rückstandskonzentrationen, wie sie in Lebensmitteln tierischen Ursprungs vorliegen, nicht zu erwarten sind (DEWDNEY et al., 1991). Während β -Laktam-Antibiotika und Sulfonamiden ein hohes Allergie-Potential zugesprochen werden, sind derartige Erscheinungen nach Verabreichung therapeutischer Dosen von Chloramphenicol, Streptomycin und Tetracyclin eher selten (KNOTHE und DETTE, 1982).

Besondere Aufmerksamkeit wird weiterhin der Entstehung bakterieller Resistenzen der Darmkeime sowie der Übertragung resistenter Keime von Tieren auf den Menschen entgegengebracht (TERPLAN und ZAADHOF, 1979; PIDDOCK, 1996; PAIGE et al., 1997). BRADY et al. (1993) zeigten in in-vitro-Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, dass bei der Resistenzentwicklung Antibiotikarückstände in nach FDA-Vorschlägen als "safe-levels" angesehenen Konzentrationen noch eine Rolle spielen. TEUBER (2001) beschreibt anhand molekularbiologischer Analysen verschiedener Keime (u.a. Campylobacter, Staphylokokken und Enterokokken) identische Resistenzmuster der jeweiligen Keime bei Tier und Mensch und mahnt, ebenso wie LATHERS (2001), die Risikoanalysen zur Resistenzproblematik in den USA mit ähnlichen Ergebnissen schildert, zum umsichtigen Einsatz antimikrobieller Stoffe in der Veterinärmedizin. Therapieresistente Keime bergen ein erhöhtes Risiko in der Behandlung humaner, aber auch veterinärmedizinischer Erkrankungen (SUNDLOF und COOPER, 1995).

Im Tierversuch verursachte Sulfamethazin bei Ratten und Mäusen Schilddrüsenkarzinome, Milztumore und Störungen der Reproduktion (LITTLEFIELD et al., 1990). Andere Sulfonamide riefen ebenfalls Effekte an der Schilddrüse von Versuchstieren sowie mitotische und chromosomale Abnormalitäten in Zellversuchen hervor (BADR, 1982), wobei die direkte Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen nicht ohne weiteres angenommen werden darf. β -Laktam-Antibiotika gelten hingegen, abgesehen von allergischen Reaktionen (WICHER et al., 1969), als relativ untoxisch (EMEA, 1997). Toxische Plasmakonzentrationen durch Aufnahme von (Dihydro)-Streptomycinrückständen in Lebensmitteln müssen wegen der geringen Resorbierbarkeit aus dem Magen-Darm-Trakt nicht befürchtet werden (SCHUMACHER, 1962). Auch kanzerogene, mutagene oder teratogene Effekte konnten in einer neueren Studie (EMEA, 2000) für diese Antibiotika bei Nagetieren nicht nachgewiesen werden.

Neben der toxikologischen Bewertung von antimikrobiell wirksamen Rückständen in Milch spielt auch der Aspekt der technologischen Sicherheit eine wichtige Rolle. Durch die Verarbeitung antibiotika- und sulfonamidhaltiger Milch kann es durch Hemmung produktionsnotwendiger Milchsäurebakterien zu hohen ökonomischen Verlusten in der Käse-, Joghurt-, Butter- und Sauermilchproduktion kommen (BEYER, 1986; SCHIFFMANN et al., 1992). Folge der mangelnden Milchsäuerung sind Qualitätsminderungen, wie z. B. sensorische Verän-

derungen oder mangelnde Aromabildung, bis hin zur Fehlproduktion. Bei Käse können des weiteren fehlende oder falsche Lochbildung und Beeinträchtigung der Schimmelbildung auftreten. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Empfindlichkeiten technologisch wichtiger Keime auf eine Reihe verschiedener Antiinfektiva findet sich bei SUHREN (1996).

2.1.3 Rechtliche Grundlagen

Die Forderung nach weitgehender Rückstandsfreiheit hat nach dem Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) bereits seit längerem Gesetzeskraft (SUHREN et al., 1994). Nach § 15 LMBG ist es verboten, Lebensmittel gewerbsmäßig in Verkehr zu bringen, wenn Stoffe mit pharmakologischer Wirkung festgesetzte Höchstmengen (Maximum Residue Limits = MRL) überschreiten. Die genaue Festsetzung der MRL-Werte wird in der **Verordnung (EWG) Nr. 2377/90** des Rates „Zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs“ vom 26. Juni 1990 (Abl. L224 vom 18.8.1990, S 1-8), zuletzt geändert durch VO (EG) Nr. 61/2003 vom 16.1.2003 der Kommission geregelt. Aufgrund dieser Verordnung werden Arzneimittel, die neue pharmakologische Stoffe enthalten, zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren nur dann zugelassen, wenn für die verwendeten Wirkstoffe Rückstandshöchstwerte in essbaren Geweben und anderen tierischen Produkten festgelegt worden sind (WOODWARD, 1993). Die Bewertung der Wirkstoffe im MRL-Verfahren führt in der Regel zu ihrer Aufnahme in einen der Anhänge I bis IV der VO (EWG) Nr. 2377/90, in denen die zur analytischen Lebensmitteluntersuchung festgelegten Markerrückstände mit den zugehörigen Rückstandshöchstwerten und die jeweilige Tierart sowie die Zielgewebe für die Rückstandsüberwachung und eventuelle Sonderbestimmungen aufgeführt sind. Anhang I enthält Stoffe mit endgültigen MRL-Werten, Anhang II Stoffe, deren Rückstände für Verbraucher in allen Konzentrationen unbedenklich sind. Anhang III ist ein Verzeichnis der Stoffe, für die vorläufige Höchstmengen festgelegt sind (max. 5 Jahre) und in Anhang IV sind die Stoffe zusammengestellt, für die keine unbedenklichen Höchstmengen festgelegt werden konnten. Die Anwendung dieser Wirkstoffe ist in der EU daher bei allen lebensmittelliefernden Tieren verboten. MRL-Werte von in Anhang I aufgeführten Antiinfektiva, für die in der vorliegenden Arbeit Nachweisverfahren entwickelt wurden, sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Höchstmengen (MRLs) der untersuchten Antibiotika und Sulfonamide in Milch nach Verordnung (EWG) 2377/90, Anhang I

Pharmakologisch wirksame Substanz	Marker-Rückstand	MRL (µg/kg)	Sonstige Vorschriften
Benzylpenicillin/ Penethamat	Benzylpenicillin	4	
Ampicillin	Ampicillin	4	
Amoxicillin	Amoxicillin	4	
Cloxacillin	Cloxacillin	30	
Dicloxacillin	Dicloxacillin	30	
Nafcillin	Nafcillin	30	
Oxacillin	Oxacillin	30	
Streptomycin	Streptomycin	200	
Sulfadiazin	Sulfadiazin	100	die Rückstände aller Stoffe der Sulfonamidgruppe dürfen insges. 100 µg/kg nicht überschreiten
Sulfamethazin	Sulfamethazin	100	

Milcherzeuger sind zum einen nach dem **Arzneimittelgesetz** (AMG, § 58 Anwendung bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen) zur ordnungsgemäßen Anwendung von Tierarzneimitteln verpflichtet. Zum anderen müssen sie nach LMBG (§ 15, Stoffe mit pharmakologischer Wirkung) die Einhaltung der Wartezeiten beachten. Die Halter von Tieren müssen ein Bestandsbuch führen, in dem die Anwendung von Arzneimitteln dokumentiert wird, die Tierärzte müssen einen Arzneimittel-Anwendungs- und Abgabebeleg mit der Angabe der einzuhaltenden Wartezeit ausfüllen. Nach **Milch-Güte-VO** wird Anlieferungsmilch in Deutschland sowie in zahlreichen anderen europäischen Ländern (ALLISON, 1985) für die Qualitätsbezahlung auf das Vorkommen von Hemmstoffen bzw. Antibiotika-Rückständen untersucht. In Deutschland ist eine zweimalige Untersuchung im Monat vorgeschrieben, in Bayern wird die Hemmstofffreiheit durch die Tätigkeit des Bayerischen Milchprüfrings durch vier Proben pro Monat geprüft. Sind Hemmstoffe vorhanden, beträgt der Abzug je positivem

Ergebnis 5 ct./kg. Jedoch beinhaltet die Untersuchung auf „Hemmstoffe“ keine weitere Identifizierung der einem positiven Testergebnis zugrunde liegenden Wirkstoffe.

Inhaber bzw. Geschäftsführer von Be- und Verarbeitungsbetrieben müssen neben den amtlichen Untersuchungen zusätzlich nach § 16 **Milch-VO** - in Umsetzung des Artikel 14 der **EG-Milchhygienerichtlinie 92/46** - Eigenkontrollen durchführen, die die Einhaltung von MRLs, Höchstmengen u. ä. sicherstellen sollen (HEESCHEN, 1993). Für diese Untersuchungen sind jedoch weder Probenfrequenz und Probenahmeebene noch die anzuwendenden Untersuchungsverfahren geregelt (SUHREN, 2002).

Die Lebensmittelüberwachung führt die Untersuchungen im Rahmen des nationalen Rückstandskontrollplans durch. Nach der **Richtlinie 96/23/EWG** des Rates über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen wird für jedes EU-Land ein Rückstandskontrollplan zur Überwachung tierischer Erzeugnisse auf Rückstände von gesundheitlich unerwünschten Stoffen bereits von Beginn des Produktionsprozesses an vorgeschrieben. Der Rückstandskontrollplan wird jährlich neu erstellt. Er enthält für jedes Bundesland konkrete Vorgaben über die Anzahl der zu untersuchenden Tiere oder tierischen Erzeugnisse, die zu untersuchenden Stoffe, die anzuwendende Methodik und die Probenahme. Seit 1999 wird u.a. auch Milch nach den EU-weit geltenden Vorschriften kontrolliert.

Das Vorkommen bzw. der Nachweis von Hemmstoffen, Antibiotika und Sulfonamiden in Milch und Milchprodukten wird mit unterschiedlichen Zielsetzungen beurteilt. Während nach dem LMBG zur Sicherung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit Lebensmittel, die Antibiotika oder Sulfonamide oberhalb der jeweiligen MRL-Werte enthalten, nicht verkehrsfähig sind und gegebenenfalls einen Straftatsbestand darstellen, ist nach Milch-Güte-Verordnung ein positiver „Hemmstoffbefund“ ein Qualitätsmangel und wird mit Milchgeldabzügen geahndet (HEESCHEN, 1993). In den amtlichen Erläuterungen zur 5. VO zur Änderung der Milch-Güte-VO wird deutlich gemacht, dass eine Hemmstoffuntersuchung nicht die Untersuchungen aus lebensmittelrechtlicher Sicht abdeckt.

2.2 Charakteristika einiger Antiinfektiva

2.2.1 Penicilline

2.2.1.1 Geschichte

1928/1929 beobachtete Alexander Fleming die antibakterielle Wirkung eines zufällig auf eine Kulturplatte geratenen Schimmelpilzes. Bei der Züchtung dieses Pilzes in Nährlösung enthielt diese ein antibakteriell wirkendes Agens, dem er den Namen "Penicillin" gab (FLEMING, 1929). Erste Erfolge zur lokalen Therapie bei infizierten Wunden wurden 1939 durch Florey, Chain, Heatley, Abraham und Mitarbeitern durch die Reindarstellung von Penicillin sowie in ersten klinischen Versuchen (ABRAHAM, 1983) erzielt. Es folgten die erstmalige Produktion von Penicillin während des zweiten Weltkrieges, weitere klinische Studien und die Entdeckung und Synthese weiterer Penicilline. 1945 wurden Fleming, Chain und Florey für ihre bahnbrechenden Forschungsarbeiten mit den Nobelpreis ausgezeichnet.

2.2.1.2 Struktur und Synthese

Penicilline werden biosynthetisch von *Penicillium notatum/chrysogenum* gewonnen. Das Grundgerüst aller Penicilline ist die 6-Aminopenicillansäure (6-APA), ein bicyclisches Dipeptid aus Cystein und Valin. Formal kann 6-APA in ein β -Laktam- und Thiazolidinringsystem unterteilt werden (OTTEN et al., 1975; Abb. 1). Die verschiedenen natürlich vorkommenden und semisynthetischen Penicilline unterscheiden sich vor allem in der Seitenkette, die aus der Kondensation zwischen einer Carboxylfunktion und der Aminogruppe der 6-APA resultiert (HOU und POOLE, 1971).

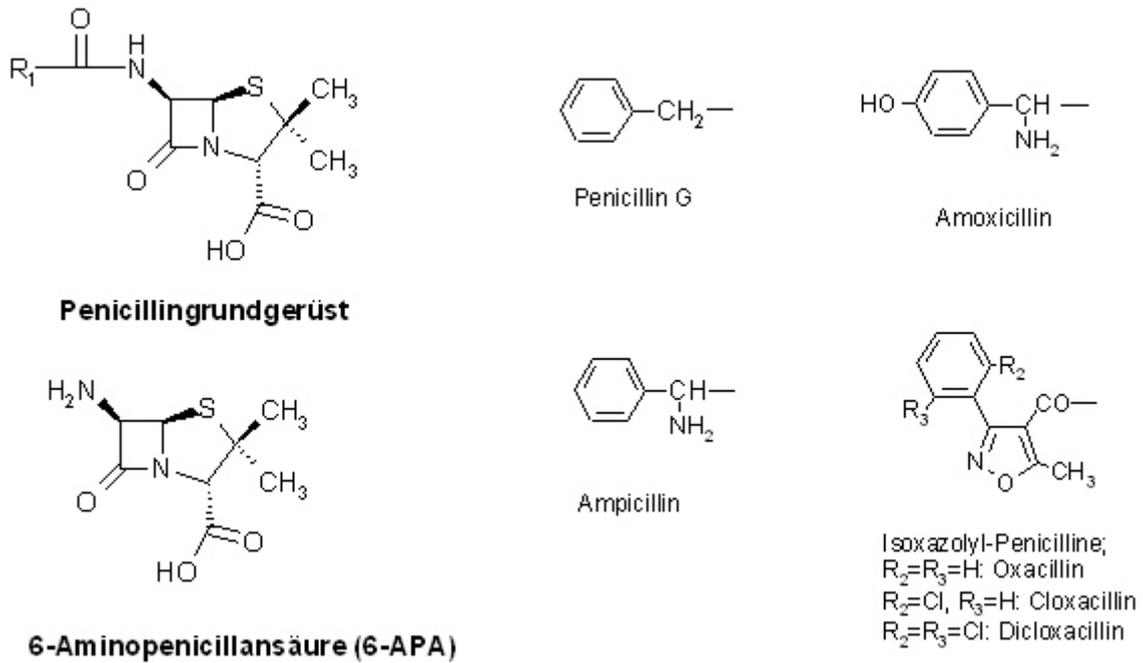


Abbildung 1: Strukturformeln des Penicillin-Grundgerüsts und wichtiger Penicilline.

2.2.1.3 Wirkungsprinzip

Die Wirkungsweise der Penicilline ist bakterizid. Der Wirkmechanismus ist an den β -Laktamring geknüpft, dessen Reaktivität und Selektivität gegenüber biologischen Substraten durch Substituenten entscheidend beeinflusst werden kann (DÜRCKHEIMER et al., 1985). Angriffsorte sind die bakteriellen Peptidoglykansynthetasen (Mureinsynthetasen) der Bakterienzellwand, die auch als “penicillin binding proteins” (PBPs) bezeichnet werden. Unter Aufspaltung des β -Laktamrings werden diese Enzyme in der Wachstumsphase der Bakterien selektiv gehemmt, so dass das für das Stützgerüst der Bakterienzelle essentielle Peptidoglykan nicht synthetisiert werden kann. Folge ist eine Abnahme der Quervernetzung der Glykopeptidstränge, über die entstehenden Lücken kommt es infolge des wachsenden Innendrucks zur Lysis. Der Wirkmechanismus macht deutlich, dass nur proliferierende Bakterien betroffen sind und β -Laktamantibiotika für tierische Zellen, für die die Mureinsynthetasen beim Aufbau der Zellmembran keine Rolle spielen, nicht zytotoxisch wirksam sind (DÜRCKHEIMER et al., 1985; FORTH et al., 1996; LÖSCHER et al., 1999).

2.2.1.4 Wirkungsspektrum

Das Wirkungsspektrum umfaßt im wesentlichen grampositive Keime, Leptospiren und Aktinomycceten (SCHUMACHER, 1962). Empfindlich gegen Benzylpenicillin sind nach LÖSCHER et al. (1999) Streptokokken, Staphylokokken (Ausnahme: Penicillinase-Bildner), Pneumokokken, Corynebakterien, Listerien, Erysipelothrix, *Pasteurella multocida*, Bacteroides, Fusobakterien und Spirochaeten. Unterschiedlich empfindlich sind Listerien, Clostridien und Campylobacter. *E. coli* und Proteus sind häufig aufgrund der Bildung von Penicillinasen resistent. Die Stabilität der Isoxazolyl-Penicilline gegenüber bakteriellen Penicillinasen ermöglichen einen Einsatz in der Behandlung von β -Laktamase bildenden Staphylokokken sowie von z.B. *Actinomyces pyogenes*.

2.2.1.5 Resistenzentwicklung

Die Resistenzentwicklung gegenüber Penicillinen kann auf drei verschiedenen Mechanismen beruhen. Der bekannteste und häufigste ist die Produktion von Penicillin- β -Laktamasen, die die β -Laktambindung hydrolytisch spalten und dadurch das Antibiotikum inaktivieren (OTTEN et al., 1975; FORTH et al., 1996). Dabei kann die Weitergabe über R-Faktoren (gram-negative Keime) oder Plasmide (*Staph. aureus*) erfolgen (FREY und LÖSCHER, 1996). Mutationen, die zu strukturell veränderten PBPs führen, und Änderungen der Zellwandpermeabilität, die zu unzureichender Penetration des Penicillins in die Keime führt, stellen weitere Resistenzmechanismen dar.

2.2.2 Streptomycin und Dihydrostreptomycin

2.2.2.1 Geschichte

Als Ergebnis einer großangelegten systematischen Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen zur therapeutischen Anwendung gelang es der Arbeitsgruppe um S. A. Waksman 1943 erstmalig, Streptomycin aus *Streptomyces griseus* zu isolieren (OTTEN et al., 1975), wofür ihm 1952 der Nobelpreis verliehen wurde. Erste experimentelle chemotherapeutische Daten zeigten, dass neben dem breiten Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Erreger besonders die Wirkung gegen Tuberkelbakterien von herausragender Bedeutung war (WAKSMAN, 1965). Wenig später, 1947, wurde durch katalytische Hydrierung von Streptomycin Dihydrostreptomycin hergestellt, insbesondere, um die den Nervus vestibularis schädigende Wirkung durch Streptomycin zu reduzieren. Allerdings zeigte sich später, dass Dihydrostreptomycin eine erhöhte toxische Affinität zum Nervus cochlearis aufwies.

2.2.2.2 Struktur und Synthese

Heute werden Aminoglykosid-Antibiotika biosynthetisch oder semisynthetisch von *Streptomyces*-Arten (-mycin) oder von *Micromonospora*-Arten (-micin) gewonnen (FREY und LÖSCHER, 1996). Die Grundstruktur besteht aus den drei Molekülteilen Streptidin, Streptose und N-methyl-l-glucosamin (Abb. 2). Die ungebundenen NH₂-Gruppen verleihen den Aminoglykosiden im neutralen und alkalischen Milieu leicht basische und nukleophile Eigenschaften, welche für die antibakterielle Aktivität entscheidend sind (FORTH et al., 1996).

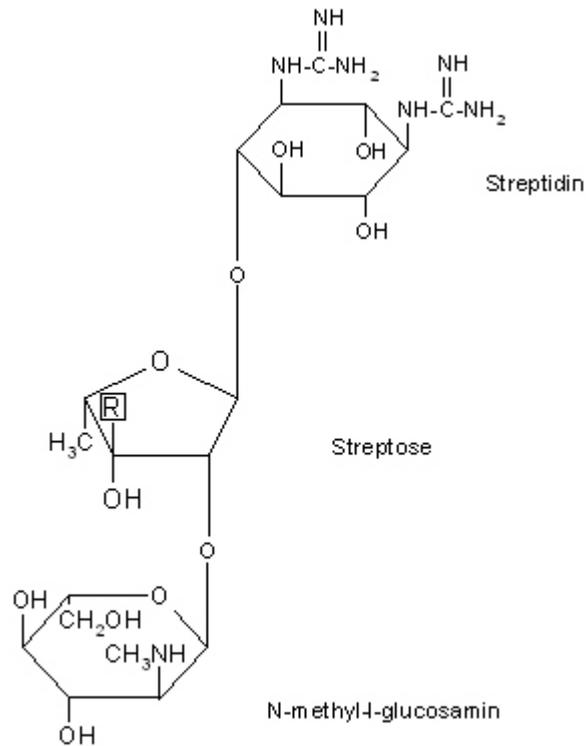


Abbildung 2: Grundstruktur von (Dihydro-)Streptomycin, bestehend aus den drei Molekülen Streptidin, Streptose und N-methyl-l-glucosamin.

$R = CHO = \text{Streptomycin}$; $R = CH_2OH = \text{Dihydrostreptomycin}$.

2.2.2.3 Wirkungsprinzip

Das bakterizid wirksame Streptomycin bindet sich nach Einschleusung ins Zytoplasma der Bakterien an die 30S-Untereinheiten der Ribosomen und verursacht dadurch Fehlsteuerungen in der ribosomalen Proteinsynthese (Bildung sog. "Nonsense-Proteine") (WALLACE et al., 1973; ZIERHUT et al., 1979). Zusätzlich kommt es durch Permeabilitätsveränderungen der Zytoplasmamembran zu Verlusten von Nukleotiden, Aminosäuren und Kalium mit Stoffwechselstörungen (OTTEN et al., 1975).

2.2.2.4 Wirkungsspektrum

Streptomycin und Dihydrostreptomycin besitzen ein breites Wirkungsspektrum sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Keime. Als sensibel gelten nach FORTH et al. (1996) *Staph. aureus*, koagulase-negative Staphylokokken und die Mehrzahl der A-Streptokokken. “Mäßig sensibel” bis “resistent” reagieren B-Streptokokken, Enterokokken und die meisten anderen grampositiven Bakterienarten. Unwirksam sind Streptomycin und Dihydrostreptomycin gegen Viren, Rickettsien, Spirochäten und Pilze (SCHUMACHER, 1962). Bei der Kombination mit β -Laktamantibiotika treten synergistische Effekte auf, da offenbar durch die Zellwandschädigung der Bakterien die Penetration der Aminoglykoside erleichtert wird (LÖSCHER et al., 1999).

2.2.2.5 Resistenzentwicklung

Als typischer Vertreter der one-step-Resistenzbildung kann Streptomycin außerordentlich schnell eine “mutagene” hoch-resistente Keimpopulation bewirken (WEINSTEIN und EHRENKRANZ, 1958). Neben der chromosomalen, genetisch fixierten Resistenz, die die Bindung an die 30 S-Untereinheit verhindert, können episomale, durch R-Faktoren bedingte Resistenzen vorkommen. Letztere beruhen auf der Bildung von inaktivierenden Enzymen und stellen ein wesentliches Problem des sogenannten “Hospitalismus” dar (ELIOPOULOS et al., 1984; LÖSCHER et al., 1999). Zwischen anderen Aminoglykosid-Antibiotika bestehen Parallelresistenzen, die jedoch gegenüber Streptomycin durch dessen strukturelle Sonderstellung (Streptamin-Derivat) meist nur partiell ausgeprägt sind.

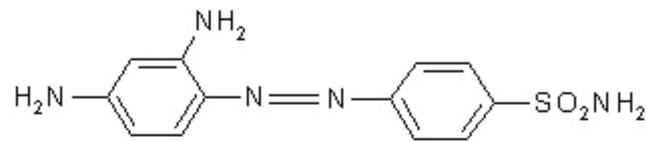
2.2.3 Sulfonamide

2.2.3.1 Geschichte

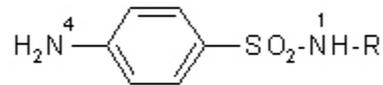
Bereits 1908 wurde Sulfanilamid synthetisiert. Im Rahmen eines systematischen Untersuchungsprogrammes synthetisierten E. Mietzsch und J. Klarer Sulfanilamid-enthaltende Azofarbstoffe (Verbindungen mit der chromophoren Azogruppe -N=N-) und leiteten damit die Ära der antibakteriellen Chemotherapie ein. Gerhard Domagk, Leiter des Pathologischen Instituts der I. G. Farbenindustrie Elberfeld (heute: Bayer AG), entdeckte 1935 die herausragende Heilwirkung des ungiftigen, gut verträglichen Prontosil rubrum auf Streptokokkeninfektionen im Tierversuch und beim Menschen (DOMAGK, 1935) und erhielt dafür 1939 den Nobelpreis für Medizin. Tréfouel, Nitti und Bovet vom Pasteur-Institut Paris erkannten 1935, dass für die Wirkung des Prontosils das p-Aminobenzolsulfonamid (Sulfanilamid) als eigentliche antibakterielle Wirkstoffkomponente entscheidend ist. Danach konnte die gezielte Synthese zahlreicher Derivate in Angriff genommen werden.

2.2.3.2 Struktur und Synthese

Die Bezeichnung „Sulfonamide“ wird in der organischen Chemie für alle Amide aromatischer Sulfonsäuren verwendet. Es handelt sich dabei um Derivate des p-Aminobenzolsulfonamids (Sulfanilamid, Abb. 3) (LÖSCHER et al., 1999), wobei die Substitution am N¹ für die antimikrobielle Wirksamkeit verantwortlich gemacht wird. Es zeigte sich, daß eine Substitution des Amidstickstoffs (N¹) mit einem heterozyklischen Rest im allgemeinen eine Steigerung der Wirkungsintensität, eine Verlängerung der Eliminationshalbwertszeit sowie eine Verbesserung verschiedener anderer Eigenschaften (Löslichkeit, Kinetik, Acetylierungsquote, Verträglichkeit) bewirkt. Demgegenüber hat die Substitution der aromatischen Aminogruppe (N⁴) in der Regel einen Verlust der antibakteriellen Aktivität und eine Verringerung der Resorption zur Folge. Die freie para-Aminogruppe (N⁴) ist eine essentielle Voraussetzung für die Wirksamkeit (NOUWS et al., 1986).



Prontosil rubrum



Sulfanilamid (R: -H)



p-Aminobenzoessäure (PABA)

Abbildung 3: Das erste Sulfonamid, der Azofarbstoff Prontosil, die wirksame Grundform Sulfanilamid und der Antagonist PABA.

2.2.3.3 Wirkungsprinzip

Der Wirkungsmechanismus der Sulfonamide beruht auf einer kompetitiven Hemmung der Dihydropterinsäure-Synthetase durch Substratkonkurrenz zur p-Aminobenzoessäure, wodurch es im wachsenden Organismus zu einer Hemmung der Synthese von Folsäure kommt, einem wichtigen Baustein der bakteriellen DNA-, RNA- und Eiweißsynthese. Über diesen Eingriff in die Folsäuresynthese wird, nach einer konzentrationsabhängigen Latenzzeit, in der die bereits synthetisierte Folsäure verbraucht wird, die Bakterienentwicklung gehemmt (bakteriostatischer Effekt), wodurch die körpereigenen Abwehrkräfte in die Lage versetzt werden, die Bakterien abzutöten (LÖSCHER et al., 1999). Da der Mensch Folsäure - als Vitamin - präformiert mit der Nahrung aufnimmt, umgeht sein Zellstoffwechsel diesen Sulfonamideffekt (BARNETT und BUSHBY, 1970). Durch Kombination mit Dihydrofolat-Reduktase-hemmern, wie z.B.

Trimethoprim und Tetroxoprim, kann der Effekt der Sulfonamide noch synergistisch verstärkt werden. Durch diese Doppelblockade kann die Dosis erniedrigt werden bzw. treten bei sehr empfindlichen Erregerstämmen bakterizide Effekte auf (AHLERS und ANDRESEN, 1971; LÖSCHER, 1984).

2.2.3.4 Wirkungsspektrum

Das Wirkspektrum der Sulfonamide ist sehr breit (GILDOW et al., 1938; BUSHBY, 1980; LÖSCHER et al., 1999). Es umfaßt neben vielen grampositiven und gramnegativen Bakterienarten auch einige Chlamydien, Yersinien und Protozoen (Kokzidien, Toxoplasmen), sowie Stämme bestimmter atypischer Mykobakterien. Anaerob wachsende Spezies sind jedoch resistent. Eine hohe antibakterielle Aktivität kann gegen *E. coli*, Shigella-Arten, Klebsiella-Arten, *Proteus vulgaris*, *Pasteurella multocida* und *haemolytica*, Staphylokokken-Arten (z.B. *Staph. aureus*), Streptokokken-Arten, Pneumokokken, Salmonellen- und Actinomyces-Arten beobachtet werden. Eine z.T. weniger ausgeprägte Wirkung besteht ferner gegenüber Brucella-Arten, Clostridien, *Listeria monocytogenes*, Corynebakterien, Bordetellen, Haemophilus-Arten, *Actinobacillus lignieresii* und Pseudomonas-Arten (LÖSCHER et al., 1999).

2.2.3.5 Resistenzentwicklung

Im gesamten Wirkspektrum bestehen erhebliche Resistenzen (FORTH et al., 1996; LÖSCHER et al., 1999). Stets oder meist resistent sind Coxiellen, Enterokokken, Leptospiren, Mykoplasmen, Rickettsien und Treponemen. Eine einmal entwickelte Resistenz ist im allgemeinen irreversibel und betrifft die ganze Gruppe der Sulfonamide, Kreuz-/Parallelresistenzen zu anderen Chemotherapeutika wurden bislang nicht beschrieben (BUSHBY, 1980). Resistenzen entwickeln sich durch natürliche Selektion, spontane Mutationen, Enzymadaptation oder bei gramnegativen Keimen durch Übertragung von resistenztragenden Plasmiden. Resistente Stämme synthetisieren übermäßig viel p-Aminobenzoesäure oder besitzen Isoenzyme der Dihydropterinsäure-Synthetase mit geringerer Sulfonamid-Affinität.

2.3 Nachweisverfahren für Tierarzneimittel-Rückstände in Milch

2.3.1 Allgemeines

Zum Nachweis der wichtigsten in der Veterinärmedizin gebräuchlichen antibiotisch wirksamen Pharmaka in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurde eine Vielzahl von Analysemethoden entwickelt und modifiziert, die sich in mikrobiologische, physikalisch-chemische und immunologische Verfahren einteilen lassen. Jedoch ist es bis jetzt nicht möglich, mit einer einzelnen Methode alle Antiinfektiva auf MRL-Niveau zu erfassen (SUHREN, 2002). Zur Sicherstellung der technologischen Qualität von Milch und ihrer Sicherheit für den Verbraucher entwickelten HEESCHEN und SUHREN (1996) ein sogenanntes "integriertes Nachweis-system", das zum einen die Verantwortlichkeiten von Milcherzeuger, Milchverarbeiter und Lebensmittelüberwachung festlegt, zum anderen durch Methodenkombinationen mit unterschiedlicher "Untersuchungstiefe" eine bestmögliche Erfassung aller Substanzen gewährleisten soll (Abb. 4).

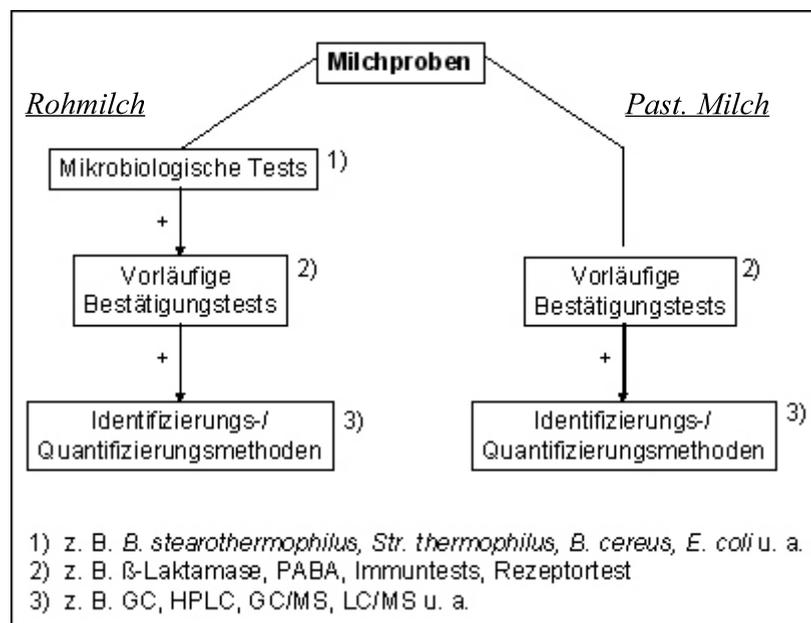


Abbildung 4: Nachweis von Antiinfektiva in roher und pasteurisierter Milch - Untersuchungskonzept (gem. VO 2377/90 EWG bzw. Milchhygiene-Richtlinie 92/46 EWG; SUHREN et al., 1996).

2.3.2 Mikrobiologische Hemmstofftests

2.3.2.1 Allgemeines

Das Testprinzip mikrobiologischer Hemmstofftests basiert auf der Hemmung des Wachstums oder der Stoffwechselaktivität empfindlicher Testkeime durch Hemmstoffe (MITCHELL et al., 1998). Häufig verwendete Testorganismen sind *Bacillus (B.) stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *B. megaterium* und *Streptococcus thermophilus*. Je nach Testformat kann das Vorhandensein von Hemmstoffen anhand der Größe der Hemmhöfe oder der Farbe zugesetzter Indikatoren beurteilt werden, eine Klassifizierung der Rückstände ist durch verschiedene Zusätze zum Nährboden bedingt möglich (Penicillinase, PABA).

Zu den Vorteilen mikrobieller Hemmstofftests zählen ihre Kostengünstigkeit und einfache Durchführung. Sie eignen sich zum Screening größerer Probenmengen und zeichnen sich durch ein relativ breites Nachweisspektrum aus. Nachteilig wirken sich die relativ langen Testzeiten von 2,5-18 Stunden aus, sowie die eingeschränkten Möglichkeiten zur Substanzidentifizierung und Quantifizierung (MITCHELL et al., 1998).

2.3.2.2 Amtliche Untersuchungsmethodik

Für die Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe sind in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG zwei Methoden beschrieben. Methode L01.00-6 beschreibt den Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Blättchentest. Dazu legt man ein mit der zu untersuchenden Milchprobe getränktes Blättchen auf einen mit *B. stearothermophilus* beimpften Nährboden. In den Agar diffundierte Hemmstoffe verhindern das Keimwachstum rund um das Blättchen, so dass sich eine klare Zone (Hemmhof) bildet. Der Durchmesser des Hemmhofes hängt u.a. von der Art und Konzentration des Antiinfektivums in der Probe ab. Statt des Blättchentests wird zur Untersuchung von Sammelmilch im Rahmen der Milch-Güte-Verordnung häufig der in Methode L01.01-5 beschriebene Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) angewendet. Diesem Test ist der Redoxindikator Brillantschwarz zugesetzt, Testkeim ist wiederum *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Die Beurteilung erfolgt anhand der

mitanzusetzenden Positivkontrolle (4 µg/kg Benzylpenicillin). Als positiv sind alle Reaktionen zu beurteilen, die mindestens dem blauen Farbton der Positivkontrolle entsprechen. Im Unterschied dazu bewertet Methode L 01.00-11 („Suchverfahren“) alle Proben, die nicht die gelbe Reduktionsstufe des antibiotika-freien Kontrollansatzes aufweisen, als positiv. Eine Alternative zum BRT-Test stellen kommerzielle Testsysteme dar, die statt des Redoxindikators einen pH-Indikator (Bromkresolpurpur) enthalten. Für die dargestellten Untersuchungsverfahren ist eine Identifizierung und Quantifizierung nachgewiesener Hemmstoffe nicht vorgesehen.

2.3.2.3 Kommerzielle Hemmstofftestsysteme

Mittlerweile sind eine Reihe mikrobieller Hemmstofftestsysteme kommerziell erhältlich und wurden in zahlreichen Studien evaluiert (MACAULAY und PACKARD, 1981; ZOMER und LIEU, 1996; SCHLIEPHAKE, 1998; SUHREN und REICHMUTH, 1998). Häufig verwendete Hemmstofftestsysteme sowie ihre Nachweisgrenzen für in dieser Arbeit untersuchte Antiinfektiva sind in Tab. 5 aufgeführt. Ansätze zur Reduzierung der Testzeiten, Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit sowie zur Identifizierung von Hemmstoffen unter Verwendung unterschiedlicher Testkeime oder Nährmedien finden sich u.a. bei SØGAARD (1979), BALBI und HARTMAN (1985), YADAVALLI et al. (1985) und NOUWS et al. (1999).

Tabelle 2: Nachweisgrenzen kommerzieller Hemmstofftestsysteme für ausgesuchte Antiinfektiva nach Herstellerangaben ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Antiinfektivum	BRT Hemmstofftest (AiM, 1999)	Delvo-Test SP (Gist-Brocades GmbH, o. J.)	Charm AIM 96- Test (Charm Sciences Inc., 1993)
Penicillin G	2-3	3	3
Ampicillin	2-3	3-4	4
Amoxicillin	2-3	3-4	4
Oxacillin	5-10	10	30
Cloxacillin	20-30	15-25	20
Dicloxacillin	10-20	10-15	20
Nafcillin	10-15	5-8	k. A.
Sulfamethazin	1500-2500	250	50
Dihydrostreptomycin	1000-2000	2500	k. A.

2.3.3 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

2.3.3.1 Allgemeines

Zu den physikalisch-chemischen Methoden zum Nachweis von Antibiotika- und Sulfonamid-Rückständen zählen colorimetrische, spektrophotometrische, elektrophoretische und chromatographische Verfahren. Die größte Bedeutung kommt den chromatographischen Verfahren zu. Die Auftrennung der einzelnen Substanzen erfolgt mittels Dünnschicht- (DC), Gas- (GC) oder Flüssigkeitschromatographie (z.B. HPLC), wobei als Detektionsverfahren meist UV-Absorption, Fluoreszenz oder die Massenspektrometrie verwendet werden. Chromatographische Methoden sind in der Lage, geringe Rückstandsmengen zu spezifizieren und zu quantifizieren und finden daher breite Anwendung in der Referenzdiagnostik und als Bestätigungstests. Als nachteilig wirken sich die hohen Kosten für die Analysengeräte, die Anforderungen an hochqualifiziertes

Personal und eine intensive Probenaufarbeitung aus, womit der Einsatz in der Routinediagnostik oder zum Screening größerer Probemengen nur begrenzt möglich ist (MITCHELL et al., 1998). Ausführliche Zusammenstellungen chromatographischer Verfahren für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen finden sich u.a. bei MEIER (1991), SCHNAPPINGER (1992) und LOCHBIHLER (1994).

2.3.3.2 Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie

Neuere dünnschichtchromatographische Verfahren zum Nachweis von Penicillinen finden sich z.B. bei MOATS (1983) und ABJEAN und LAHOGUE (1997). MOATS (1983) erreicht für Penicillin G und Cloxacillin in Milch eine Nachweisgrenze von 4 µg/kg mittels Detektion von durch Jod angefärbte Stärke. ABJEAN und LAHOGUE (1997) beschreiben den Nachweis von Ampicillin in Milch und Muskulatur auf MRL-Niveau. Die Visualisierung wurde hier mittels Fluoreszenz von Quecksilber-Chlorid ermöglicht. MEDINA und UNRUH (1995) entwickelten eine DC-Multi-Methode für den Nachweis von fünf Aminoglykosiden in Plasma und Serum. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung nach Applikation von Fluorescamin bei einer Nachweisgrenze von 5 µg/kg. Dünnschichtchromatographische Methoden zum Nachweis von Sulfonamidrückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs finden sich bei MARTINEZ GARCIA et al. (1998) und ABJEAN (1997). Erstere beschreiben die Differenzierung von Sulfadiazin, Sulfamethazin, Sulfadimethoxin und Sulfadoxin in Muskelfleisch nach Derivatisierung mit Naphthylethylenediamin. ABJEAN (1997) detektierte gleichzeitig Chloramphenicol-, Nitrofurantoin- und Sulfonamidrückstände in Fleisch durch Messung bei langwelligem UV-Licht nach Reaktion mit Fluorescamin.

2.3.3.3 Nachweis mittels Gaschromatographie

Die GC wird vor allem in der Analytik von Pestiziden, chlorierten Umweltkontaminanten und hormonell wirksamen Substanzen eingesetzt. Gaschromatographische Methoden zum simultanen Nachweis von neun Sulfonamiden werden von CHIAVARINO et al. (1998) beschrieben. MEETSCHEN und PETZ stellten 1991 ein kapillargaschromatographisches

Verfahren zum Nachweis von sieben Penicillinen in Milch, Muskulatur, Fettgewebe, Leber und Niere vor. Die Nachweisgrenzen in Milch lagen für alle untersuchten Substanzen zwischen 0,1 und 1,3 µg/kg. PREU et al. (1998) entwickelten eine GC-Methode mit zweistufiger Derivatisierung zum Nachweis von Kanamycin und Gentamicin unterhalb der vorgegebenen MRL-Werte.

2.3.3.4 Nachweis mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Aufgrund der überlegenen Trennleistung und Nachweisempfindlichkeit wird die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) im überwiegenden Maße zur Analytik von Arzneimittelrückständen eingesetzt. Neben der Untersuchung von Lebensmitteln auf Tierarzneimittelrückstände gewinnt auch die Analyse von Umweltproben immer größere Bedeutung. PFEIFER et al. (2002) wiesen z.B. Sulfonamide in Gülle nach Extraktion mit Ethylacetat bis zu einer Konzentration von 0,4-0,5 µg/kg nach. In Tab. 3 sind neuere in der Literatur beschriebene Beispiele für den flüssigkeitschromatographischen Nachweis von Penicillinen, Sulfonamiden und Aminoglykosiden in Lebensmitteln tierischen Ursprungs zusammengefaßt.

Tabelle 3: Überblick über neuere Arbeiten zum flüssigkeitschromatographischen Nachweis von Penicillinen, Sulfonamiden und Aminoglykosidantibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Substanz	Probenmaterial	Extraktion	Säulenmaterial	Mobile Phase	Detektion	Nachweisgrenze (µg/kg)	Referenz
Ampi	Rohmilch	ACN	Luna C-8	ACN/Acetatpuffer/ Wasser	elektrochemisch + UV	5	DASENBROCK & LaCOURSE (1998)
Ampi, Amoxi, Pen G, Oxa, Cloxa, Dicloxa	Konsummilch, Tankmilch	Tetraethylammoniumchlorid, ACN	Supelcosil LC-18	H ₃ PO ₄ /Na-Dodecylsulfat (oder KH ₂ PO ₄)-ACN	UV	k. A.	MOATS (1999)
β-Laktam-Antibiotika	past. Konsummilch	MeOH/ Wasser	Alltima C-18 RP	MeOH/Wasser	ESI/MS	0,4 - 3	BRUNO et al. (2001)

Fortsetzung Tabelle 3:

Substanz	Proben- material	Extraktion	Säulen- material	Mobile Phase	Detektion	Nachweis- grenze (µg/kg)	Referenz
Amoxi, Ampi, Cloxa, Oxa, Pen G	past. Konsum- milch	PBS, <i>n</i> -Hexan	YMC ODS-AQ	Wasser/ACN	ESI-MS/MS	0,4 - 1,1	RIEDIKER & STADLER (2001)
Ampi, Amoxi, Pen G, Pen V, Cloxa	Rohmilch	ACN	Luna C-18	Wasser/MeOH/ Essigsäure	ESI-MS/MS	0,2 - 2	HOLSTEGE et al. (2002)
Strep, DHS	Muskula- tur, Niere	Perchlor- säure	Supelco LC 8-DB	HSA/NQS/ Wasser/ACN	Fluoreszenz	Strep: 10 DHS: 20	GERHARDT et al. (1994)
Strep	Honig	Perchlor- säure	Hypersil BDS C-18	AHS/NQS/ ACN	Fluoreszenz	> 20	KOCHER (1996)
Strep, DHS	Milch	Oxalsäure	Superspher 60 RP Select B	ACN/HSA	Fluoreszenz	Strep: 8 DHS:12	SUHREN & KNAPPSTEIN (1998)

Fortsetzung Tabelle 3:

Substanz	Proben- material	Extraktion	Säulen- material	Mobile Phase	Detektion	Nachweis- grenze (µg/kg)	Referenz
Strep	Fleisch, Leber, Niere, Milch, Honig	Perchlor- säure	Hypersil BDS	AHS/NQS/ACN	Fluoreszenz	Honig: 5 Milch: 30	EDDER et al. (1999)
Sulfonamide	Muskula- tur, Niere	Ethylacetat/ Aceton	Chrompack RP18 ODS-2	ACN/Wasser	Fluoreszenz	0,5 - 1	STOEV & MICHAILOVA (2000)
Sulfonamide	Milch	Ultrafil- tration	Mightysil RP-4 GP	EtOH/Wasser	UV	5-20	FURUSAWA & KISHIDA (2001)
Sulfonamide	past. Milch	Chloroform/ Aceton	LiChroCART RP C 18	Na-Acetat/ACN	UV	SMA: 16	PEREZ et al. (2002)

ACN = Acetonitril; AHS = 1-Heptansulfonsäure; Amoxi = Amoxicillin; Ampi = Ampicillin; APCI = atmospheric pressure chemical ionization (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck); Cloxa = Cloxacillin; DHS = Dihydrostreptomycin; Dicloxa = Dicloxacillin; ESI-MS/MS = Elektrospray-Ionisation mit Tandem-Massenspektrometrie; HSA = 1-Hexansulfonsäure; NQS = 1,2,-Naphtoquinon-4-sulfonsäure; Oxa = Oxacillin; Pen G = Penicillin G; Strep = Streptomycin

2.3.4 Klassische Immunologische Verfahren und Rezeptorschnelltests

2.3.4.1 Allgemeines

Bei **immunologischen Verfahren** wird als Nachweisprinzip die Fähigkeit von Antikörpern genutzt, spezifische molekulare Strukturen (= Antigene) von bestimmten Stoffen zu erkennen und zu binden (MÄRTLBAUER, 1995). Um diese Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion sichtbar und meßbar zu machen, werden markierte Reagenzien (Antigene oder Antikörper) verwendet. Zur Markierung dienen radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) sowie lumineszierende oder fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay, FIA). Zu den am häufigsten verwendeten Markerenzymen zählen Meerrettichperoxidase (HRP) und alkalische Phosphatase (AP).

Grundsätzlich kann nach NGO und LEHNHOFF (1981) bei Enzymimmunoassays zwischen **heterogenen** und **homogenen** Verfahren unterschieden werden, je nachdem, ob eine Trennung zwischen gebundenen und ungebundenen Reagenzien erforderlich ist oder nicht.

Darüberhinaus werden enzymimmunologische Verfahren in **kompetitive** und **nicht kompetitive** Systeme eingeteilt (EKINS, 1985). Niedermolekulare Substanzen, wie die hier untersuchten Antiinfektiva, besitzen nur eine Antikörperbindungsstelle und können nur mit kompetitiven Verfahren nachgewiesen werden. Markiertes und unmarkiertes Antigen konkurrieren hierbei um eine begrenzte Anzahl an spezifischen Antikörperbindungsstellen.

Ferner kann bei den heterogenen, kompetitiven Enzymimmuntests zwischen **direkten** und **indirekten** Verfahren unterschieden werden. Beim direkten Nachweis werden die Antikörper an die Festphase gebunden und freier und enzymmarkierter Analyt konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen. Je nachdem, ob die Inkubation der beiden Antigene gleichzeitig oder nacheinander erfolgt, werden hier wiederum **simultane** und **konsekutive** Systeme unterschieden. Beim indirekten Nachweis dient ein Hapten-Protein-Konjugat als Festkörperphase und konkurriert mit freiem Analyten (z.B. Antibiotikum in einer Probe) um eine begrenzte Anzahl an Antikörperbindungsstellen. Dabei werden umso weniger Antikörper an die Festphase gebunden, je höher die Analytkonzentration in der Probe war. Um die gebundenen Antikörper einfach bestimmen zu können, werden sie entweder direkt markiert oder über einen zweiten, tierartspezifischen enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen. Diese Bindungsreaktionen

werden sowohl im direkten als auch im indirekten System nach Zugabe von entsprechendem Enzymsubstrat sichtbar, wobei der Substratumsatz umso geringer ist, je mehr Analytmoleküle in der Probe waren. Das Testergebnis verhält sich also umgekehrt proportional zu der Konzentration des gesuchten Antigens. Nicht an die Festphase gebundene Reagenzien werden zwischen den einzelnen Schritten durch Waschen entfernt (heterogenes Verfahren).

Zusätzlich muß bei allen Systemen zwischen **homologer** und **heterologer** Kombination von Antikörpern und Enzymkonjugat unterschieden werden. Bei homologer Kombination wird zur Immunogensynthese und zur Herstellung des enzymmarkierten Antigens das gleiche Hapten verwendet. Beim heterologen Verfahren dagegen wird zur Herstellung der Enzym- oder Festphasenkonjugate entweder ein anderes Hapten, ein anderes Derivatisierungs-/Kopplungsreagenz oder eine andere Position am Molekül zur Kopplung verwendet (= Hapten-, Brücken- oder Seiten-Heterologien).

Schnelltestsysteme werden in den letzten Jahren, insbesondere im Zuge der seit 1992 EU-weit festgesetzten Höchstmengen (MRLs) und der Verpflichtung zu betrieblichen Eigenkontrollen (Milch-VO § 16 in Umsetzung § 14 der Richtlinie 92/46 EWG)), in der Milchindustrie zunehmend verwendet. Der Vorteil dieser schnell und einfach durchzuführenden Testsysteme liegt darin, dass Molkereiunternehmen Milch bereits auf Tankwagenebene auf alle in Betracht kommenden Wirkstoffe untersuchen können, um ein Überschreiten von MRLs im Endprodukt sowie technologische Probleme zu vermeiden (SUHREN und REICHMUTH, 1998). Eine weitere Einsatzmöglichkeit liegt in der Untersuchung von Sammelmilch- oder Einzelgemelken durch den Tierarzt oder Landwirt zur Vermeidung Hemmstoff-positiver Befunde (MUSSEr und ANDERSON, 1999). Den Vorteilen dieser Testkits - einfache Handhabung, kurze Analysenzeit (ca. 10 min), Gruppenspezifität - stehen jedoch auch Nachteile, wie Beeinflußbarkeit der Testergebnisse durch pH-Wert, Zellzahl oder Keimzahl, teilweise unzureichende Testsensitivität und apparativer Aufwand (Heizblock) gegenüber (KROLL, 2000).

2.3.4.2 Enzymimmunoassays

Enzymimmunologische Tests eignen sich in erster Linie als Screening-Verfahren zur Untersuchung größerer Probenmengen. Als Vorteil gegenüber den mikrobiellen Tests sind vor allem die Möglichkeit zur Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände zu nennen. Neben der herkömmlichen Immunisierung von Versuchstieren und der Gewinnung polyklonaler bzw. der Entwicklung monoklonaler Antikörper wurden auch Ansätze zur Produktion rekombinanter Antikörper zur gezielten Beeinflussung der Spezifität beschrieben (KORPIMÄKI et al., 2002). Tab. 4 enthält eine Zusammenstellung in der neueren Literatur beschriebener klassischer enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Antiinfektiva. Weiterentwicklungen der Mikrotiterplattentests führten zu der Etablierung von Teststreifen und Immunfiltrationstests (OSTERMEIER et al., 1995; SCHNAPPINGER et al., 1996; VERHEIJEN et al., 2000), sowie zu einer Reihe kommerziell erhältlicher Immuntestkits (z.B. „CITE-Probe“ von IDEXX oder „LacTek“ von IDETEK).

2.3.4.3 Kommerzielle Schnelltestsysteme

Ein gemeinsames Merkmal der kommerziell erhältlichen Schnelltestsysteme ist die Verwendung spezifischer Bindungsproteine für Antibiotika bzw. Sulfonamide (mikrobielle Rezeptorproteine bzw. -enzyme, Antikörper). Dabei blockieren in der Milchprobe enthaltene Antiinfektiva das Bindungsprotein entweder irreversibel oder in Konkurrenz mit einem an die Festphase gebundenen entsprechenden Analyten. Das Meßsignal entsteht durch die Hemmung der Enzymaktivität bzw. durch Messung des an die Festphase gebundenen Bindungsproteins und ist visuell, meist auch instrumentell, auswertbar. Voraussetzung für die im ersten Schritt erfolgende Bindungsreaktion ist eine erhöhte Temperatur (45-64 °C), die durch Verwendung eines speziellen Heizblocks ermöglicht wird. Die Nachweisgrenzen liegen laut Herstellerangaben im Bereich der jeweiligen MRL-Werte, es werden jedoch mit keinem Testsystem alle relevanten Analyten einer Substanzgruppe erfaßt (KROLL, 2000). In Tab. 5 sind einige Beispiele kommerzieller Schnelltestsysteme zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch aufgeführt.

Tabelle 4: Charakteristika enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch (Auswahl)

Immunogen	Antiserum	Methode	Nachweisgrenze (ng/ml)	Kreuzreaktionen mit	Referenz
Pen G-OVA	pAk (Schaf)	direkt	6	Pen V, Pheneticillin	JACKMAN et al. (1990)
Cloxa-HSA	pAk	direkt	3	Oxa, Dicloxa	USLEBER et al. (1994)
Cloxa-HSA	mAk	indirekt	0,9-8,2	Oxa, Dicloxa	DIETRICH et al. (1996)
6APA-KLH	pAk (Eigelb)	indirekt	k. A.	Pen G, Pen V, Ampi, Amox, Oxa, Cloxa, Dicloxa	LEUW et al. (1997)
Ampi-KLH	mAk	direkt DASP	11,7	Pen G, Amoxi, Oxa, Cloxa, Dicloxa u.a.	DIETRICH et al. (1998)
Ampi-BSA	pAk	direkt	5-20	Pen G, Amoxi, Oxa, Cloxa, Dicloxa, u.a.	USLEBER et al. (1998)
Strep-OVA	pAk	direkt	1,5	k.A.	MITCHELL et al. (1992)
Strep- Hydrazon-BSA	pAk	direkt DASP	0,6	DHS	SCHNAPPINGER (1992)

Fortsetzung Tabelle 4:

Immunogen	Antiserum	Methode	Nachweisgrenze (ng/ml)	Kreuzreaktionen mit	Referenz
SMA- BSA/OVA/HC	pAk	direkt	< 100	Sulfamerazin	FRÁNEK et al. (1999)
SUL-KLH	mAk	indirekt	< 100	acht Sulfonamide “generic antibody”	MULDOON et al. (1999)
TS-BSA/KLH	mAk	indirekt	< 100	acht Sulfonamide	HAASNoot et al. (2000)
SCP-BTG	pAk	indirekt	k. A.	15 von 21 Sulfonamiden	SPINKS et al. (2002)

BSA = bovines Serumalbumin; BTG = bovines Thyroglobulin; DASP = Double Antibody Solid Phase Technique; HC = Haemocyanin; HSA = humanes Serumalbumin; KLH = Keyhole-Limpet-Haemocyanine; mAk = monoklonaler Antikörper (Maus); OVA = Ovalbumin; pAk = polyklonale Antikörper (Kaninchen); SCP = Sulfachloropyridazin; SUL = N-sulfanilyl-4-amino-benzoesäure; TS = Thiazolsulfanilamid

Tabelle 5: Beispiele kommerzieller Schnelltests, ihr Nachweisspektrum und Detektionsprinzip

Schnelltest (Firma)	Nachweis von	Detektionsprinzip
Beta s.t.a.r. 25 (Chr. Hansen GmbH)	β -Laktam-Antibiotika	Rezeptorprotein- Goldkonjugat
Charm Rosa (MCS Diagnostics)	β -Laktam-Antibiotika; SMA, SDA, Sulfadimethoxin, Sulfathiazol; Tetracycline	Rezeptorprotein- Goldkonjugat
Cite-Probe (IDEXX)	β -Laktam-Antibiotika; SMA, Sulfathiazol, Sulfadimethoxin; Tetracycline; Gentamicin	k.A.
Parallux (IDEXX)	β -Laktam-Antibiotika; Cephapirin, Ceftiofur, Cloxacillin; SMA, Sulfathiazol, Sulfadimethoxim; Tetracycline	k.A. fluoreszenzmarkierte Antikörper
Penzym 50 (Chr. Hansen GmbH)	β -Laktam-Antibiotika	Carboxypeptidase, Aminosäureoxidase; Redoxindikator
SNAP-Test (IDEXX)	β -Laktam-Antibiotika; Tetracyclin; Gentamicin	Rezeptorprotein- Enzymkonjugat

2.3.5 Nachweisverfahren mittels Biosensortechnik

2.3.5.1 Allgemeines

Zu aktuellen Entwicklungen der letzten Jahre zählen sog. Immunsensoren, die den Biosensoren zugeordnet werden. Definitionsgemäß bestehen Biosensoren aus einer biologischen Komponente (z.B. Antikörper, Lektine, DNS, Zellen), die direkt mit einem physikalischen Transducer verbunden ist. Dieser wandelt den biochemischen/biophysikalischen Vorgang (z.B. Antigen-Antikörper-Bindung) in ein elektrisches Signal (z.B. optisch, elektrochemisch, piezoelektrisch, thermoelektrisch) um, welches verstärkt und zur Auswertung an eine elektronische Meßeinheit gesendet wird (CASS, 1990). Ein herausragender Vorteil der Lebensmittelanalytik mittels Biosensoren liegt in der Schnelligkeit und Spezifität, mit der einzelne Rückstände nachgewiesen werden können. Im Hinblick auf die Untersuchung von Milch kann meist auf eine aufwändige Probenvorbereitung verzichtet werden, wodurch die zu messenden Analyten in ihrer natürlichen Mikro-Umgebung verbleiben können und keinen Modifikationen unterliegen. Für andere Lebensmittel ist jedoch eine Probenextraktion unumgänglich. Weiterhin können bisher nur geringe Probenzahlen mittels Biosensoren untersucht werden, die Kosten für eine Analyse lassen nur wenige Anwendungen in der Routinediagnostik zu (SCOTT, 1998).

2.3.5.2 Funktionsprinzipien einiger Biosensor-Systeme

Als biologische Erkennungseinheiten werden häufig biokatalytische Rezeptoren wie Enzyme, insbesondere Oxidasen, welche kommerziell erhältlich sind und sich durch hohe Stabilität auszeichnen, sowie Zellen (z.B. Bakterien oder Pilze), Zellorganellen oder pflanzliche oder tierische Gewebe eingesetzt (DAVIS et al., 1995). Die Signaltransduktion erfolgt hierbei durch potentiometrische, amperometrische, optoelektrische oder piezoelektrische Messungen. In zahlreichen Arbeiten wird das Zusammenwirken von Enzymen und spezifischen Substraten zur Kontrolle von Lebensmitteln mittels amperometrischer Messungen beschrieben, z.B. Nachweis von Glukose, Ethanol, L-Lysin, Aminen oder Oxalat über Aktivitätsmessung spezifischer Oxidasen (RAMANATHAN et al., 2001; BOUJTITA et al., 2000; KELLY et al., 2000; BOUVRETTE et al., 1997; PEREZ et al., 2001). Insbesondere zur Bestimmung von Glukose in

Lebensmitteln über Glukoseoxidase befinden sich bereits einige kommerzielle Geräte auf dem Markt (Übersicht bei MELLO und KUBOTA, 2002). Bei der Entwicklung von Biosensoren für Antibiotika lag der Schwerpunkt bislang ebenfalls auf elektrochemischen Meßprinzipien. Zum Nachweis von Penicillinen wurde insbesondere die biologische Aktivität von Penicillin-spaltenden Enzymen (β -Laktamasen bzw. Penicillinasen, Penicillin G-Acylasen) zum potentiometrischen bzw. semikonduktometrischen Nachweis genutzt (HEALY et al., 1997; GARCIA et al., 1998; LIU et al., 1998). Der entscheidende Nachteil dieser Testsysteme liegt jedoch in der geringen Sensitivität (Nachweisgrenzen im mmolaren Bereich: $> 100 \mu\text{g}$ Penicillin/ml), so dass sich die Anwendbarkeit dieser Biosensoren auf die Quantifizierung von Penicillinen während des biotechnologischen Herstellungsprozesses dieser Antibiotika beschränkt (LESZCZYNSKA et al., 1998). Ein weiterer Biosensor mit amperometrischer Signaltransduktion wurde 1999 von SETFORD et al. beschrieben, der bei einer Nachweisgrenze von etwa 10 ng Penicillin/ml schon eher lebensmittelhygienischen Anforderungen gerecht wird.

Weiterhin spielen Hybridisierungs-Rezeptoren wie DNA- und RNA-Systeme eine wichtige Rolle in der Biosensortechnologie. Für den Nachweis genetischer Modifikationen sowie den sensitiven Nachweis und die Typisierung von Mikroorganismen (z.B. Salmonellen, Listerien, *E.coli* und *S. aureus*) erwiesen sich solche Systeme als besonders empfindlich (BOER und BEUMER, 1999). Die Detektion geschieht durch direkte Fluoreszenz-Messung oder über Enzymdetektion. Ein zukünftiges Anwendungsgebiet liegt insbesondere in der Validierung und Verifizierung von HACCP-Programmen in Lebensmittel-verarbeitenden Betrieben. Eine aufwändige Probenvorbereitung, unspezifische Bindungen, Kreuz-Hybridisierungen und vor allem die hohen Kosten stehen einem Routineeinsatz allerdings noch oft im Wege. Für DNA-Diagnostik und Sequenzanalyse im medizinischen Bereich hat die Chipstechnologie jedoch bereits Einzug gehalten (WOHLFEIL, 1999). Die gerne als "Lab-on-a-Chip" bezeichnete Microarray-Technologie liefert schnelle und genaue Informationen über die genetische Zusammensetzung von Proben. Mit ihrer Hilfe können genetische Erbkrankheiten identifiziert, Gensequenzen für bestimmte Proteine gefunden und Umwelt-DNA identifiziert werden, um nur einige der Anwendungsmöglichkeiten zu nennen.

Schließlich nehmen Antikörper als Rezeptoren einen hohen Stellenwert in der Analyse von Lebensmitteln mittels Sensortechnik ein. Systeme, basierend auf Antigen-Antikörper-Bin-

dungen, zeichnen sich durch hohe Spezifität, Selektivität und Sensitivität aus und können verschiedenen Detektionsprinzipien unterliegen. Für die Messung der Antigen-Antikörper-Reaktion werden z.B. Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe, Radionukleotide oder Avidin-Biotin-Komplexe zur Markierung der spezifischen Immunreagenzien eingesetzt (FITZPATRICK et al., 2000). Als Transducereinheit werden akustische oder optische Systeme verwendet. Insbesondere für den Nachweis von Herbiziden und Toxinen mittels auf Antikörpern basierenden Biosensorsystemen finden sich zahlreiche Veröffentlichungen. Beispielhaft seien die Arbeiten von HARTEVELD et al. (1997) und RASOOLY (2001) zum Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine A bzw. B mittels polyklonaler Antikörper erwähnt. STARODUB et al., (2000) setzten polyklonale Antikörper zum Nachweis von Herbiziden auf Gemüse in einen potentiometrischen Biosensor ein. Erst in jüngerer Zeit befaßten sich einige Arbeitsgruppen mit dem Nachweis von Antibiotika in Milch und Milchprodukten mittels Biosensor (Tab. 6). Ein häufig verwendetes Detektionsprinzip, welches in vielen kommerziellen Biosensoren Anwendung findet, ist hierbei das sog. SPR-Phänomen (Oberflächenplasmon-Resonanz; engl.: Surface Plasmon Resonance). Dieses optische System beruht auf der kollektiven Schwingungsanregung freier Elektronen in sehr dünnen Edelmetallfilmen. Die Elektronen werden durch einfallende Photonen in eine resonante Schwingung versetzt, die durch die Eigenschaften der rezeptiven, d.h. mit dem spezifischen Reaktionspartner (Antikörper oder Antigen) versehenen Sensorschicht bestimmt wird. Chemische und physikalische Änderungen in dieser Grenzschicht führen zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz. Diese Verschiebung kann sehr einfach und mit hoher Präzision gemessen werden, so dass sich bereits geringste Konzentrationsänderungen des Analyten erfassen lassen. Darüber hinaus ist eine Markierung der beteiligten Reaktionspartner nicht notwendig, Reaktionsabläufe können in Echtzeit verfolgt werden (HOMOLA et al., 1999). Jedoch eignen sich diese Geräte, die ursprünglich zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen entwickelt wurden und für den Laboreinsatz im medizinischen Bereich konzipiert waren, aufgrund des hohen finanziellen Aufwandes noch nicht zur Routineanalytik auf dem Lebensmittel-Sektor. Weiterhin können mit den bisher zur Verfügung stehenden Geräten und Immunreagenzien Parallelmessungen nur in begrenztem Rahmen durchgeführt werden, die Regenerierung der verwendeten Biochips nimmt nicht näher definierte Zeit in Anspruch (MELLGREN und STERNESJÖ, 1998). Generell sind die Möglichkeiten zur Multianalytbestimmung aufgrund limitierter Verfügbarkeit geeigneter Antikörper begrenzt (BRECHT und ABUKNESHA, 1995).

Tabelle 6: Für Tierarzneimittelrückstände entwickelte Biosensoren (Auswahl)

Substanz	Matrix	Biologische Komponente	Messprinzip	Referenz
Pen G Strep (DHS)	Sterilmilch	<i>Str. cremoris</i> , <i>B. stearothermo- philus</i>	Impedanzmessung	OKIGBO & RICHARDSON (1985)
Pen G	Milchpulver	<i>B. stearo- thermophilus</i>	Impedanzmessung	CHEN & CHANG (1994)
Pen G	Vollmilch	PBP	amperometrisch	SARKAR (1999)
β-Laktame	Rohmilch	PBP	amperometrisch	SETFORD et al. (1999)
hydrolysierte Penicilline	Rohmilch	mAk	SPR	GAUDIN et al. (2001)
Streptomycin	Vollmilch	pAk	SPR	BAXTER et al. (2001)
SMA	Rohmilch, Magermilch	pAk	SPR	STERNESJÖ et al. (1995)
SMA	past. Milch	pAk	SPR	GAUDIN & PAVY (1999)
Sulfonamide	Puffer	mAk-Mix	SPR	HAASNOOT et al. (2000)
Sulfonamide	Urin	mAk	Chemilumineszenz	McCONNELL et al. (2000)

mAk/pAk = monoklonale/polyklonale Antikörper; PBP = Penicillin-bindende Proteine; SPR = Surface Plasmon Resonance = optisches System

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton (getrocknet)	(Merck Eurolab GmbH, UN 1090)
4-Aminobenzoesäurehydrazid	(Aldrich Chemie GmbH, A4, 190-9)
Bernsteinsäureanhydrid	(Sigma Chemie GmbH, S-7626)
Bovines Serumalbumin	(Sigma Chemie GmbH, B-2518)
β-Casein	(Sigma Chemie GmbH, C-6905)
Casein (Natriumsalz)	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
1,1'-Carbonyldiimidazole	(Sigma Chemie GmbH, C-7625)
Carboxymethoxylamin-Hemihydrochlorid	(Aldrich Chemie GmbH, C1, 340-8)
N', N-Dicyclohexylcarbodiimid	(Sigma Chemie GmbH, D-3128)
N', N-Dimethylformamid	(Sigma Chemie GmbH, D-8654)
Dioxan	(Sigma Chemie GmbH, D-9553)
Ethanol 96 %	(Riedel-de Haen, 24105)
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid	(Sigma Chemie GmbH, E-7750)
Glukoseoxidase	(Roche Diagnostics GmbH, 105147)
Glutaraldehyd	(Sigma Chemie GmbH, G-6275)
N-Hydroxysuccinimid	(Sigma Chemie GmbH, H-7377)
Lysin	(Sigma Chemie GmbH, L-5626)
Magermilchpulver	(Oxoid Unipath GmbH, L31)
Meerrettichperoxidase	(Sigma Chemie GmbH, P-8375)
Natriumborhydrid	(Sigma Chemie GmbH, S-9125)
Natrium-meta-Perjodat	(Sigma Chemie GmbH, S-1147)
Ovalbumin	(Sigma Chemie GmbH, A-2512)
Penicillinase, 10.000.000 IU/ml	(Difco Laboratories, 0346-63)
Polyethylenglykol	(Sigma Chemie GmbH, P-2263)
Pyridin (getrocknet)	(Merck Eurolab GmbH, UN 1282)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T-2885)
Thimerosal	(Sigma Chemie GmbH, T-8784)
Tween 20	(Sigma Chemie GmbH, P-1379)
Xylol	(Merck Eurolab GmbH, 108681)

3.1.2 *Antibiotika und Sulfonamide*

6-Aminopenicillinsäure	(Sigma Chemie GmbH, A-1005)
Amoxicillin	(Sigma Chemie GmbH, A-8523)
Ampicillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, A-9518)
Azlocillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, A-7926)
Bacampicillin-Hydrochlorid	(Sigma Chemie GmbH, B-1885)
Carbenicillin-Dinatriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-1389)
Ceftiofur-Natriumsalz (Excenel [®])	(Pharmacia & Upjohn, 801986000)
Cephacetril-Natriumsalz	(Novartis, 97120050Z1)
Cephalexin-Hydrat	(ICN Biomedicals Inc.)
Cephapirin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8270)
Cephazolin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-5020)
Cloxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-9393)
Dicloxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, D-9016)
Dihydrostreptomycin-Sesquisulfatsalz	(Sigma Chemie GmbH, D-7253)
Epicillin	(Sigma Chemie GmbH, E-6380)
Metampicillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, M-6777)
Methicillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, M-6535)
Moxalactam-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, M-8158)
Nafcillin-Natriumsalz-Monohydrat	(Sigma Chemie GmbH, N-3269)
Oxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, O-1002)
Penicillin G-Natriumsalz (Benzylpenicillin)	(Sigma Chemie GmbH, PEN-NA)
Penicillin V (Phenoxymethylpenicillinsäure)	(Sigma Chemie GmbH, P-1376)
Pheneticillin (a-Phenoxyethylpenicillinsäure)	(Sigma Chemie GmbH, P-8271)
Piperacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, P-8396)

Streptomycin-Sulfat	(Sigma Chemie GmbH, S-6501)
Sulfachloropyridazin	(Sigma Chemie GmbH, S-9882)
Sulfadiazin	(Sigma Chemie GmbH, S-8626)
Sulfadimethoxin	(Sigma Chemie GmbH, S-7007)
Sulfaisodimidin	(Sigma Chemie GmbH, S-7505)
Sulfamerazin	(Sigma Chemie GmbH, S-8876)
Sulfameter	(Sigma Chemie GmbH, S-0383)
Sulfamethazin	(Sigma Chemie GmbH, S-6256)
Sulfamethizol	(Sigma Chemie GmbH, S-5632)
Sulfamethoxazol	(Sigma Chemie GmbH, S-7507)
Sulfamethoxypyridazin	(Sigma Chemie GmbH, S-7257)
Sulfapyridin	(Sigma Chemie GmbH, S-6252)
Sulfaquinoxalin	(Sigma Chemie GmbH, S-7382)
Sulfasalazin	(Sigma Chemie GmbH, S-0883)
Sulfathiazol	(Sigma Chemie GmbH, S-9876)
Ticarcillin-Dinatriumsalz	(SmithKline Beecham Pharma GmbH, PZN-7820338)

Zur Herstellung der Antibiotikastandard-Stammlösungen (1 mg/ml) wurden jeweils 8-12 mg eines Antibiotikums bzw. Sulfonamids in eine 20 ml-Glasflasche eingewogen und unter Berücksichtigung des Salzanteils durch Zugabe eines entsprechenden Volumens PBS gelöst. Um die Löslichkeit der Sulfonamide zu verbessern, wurden bei diesen Antiinfektiva pro ml PBS ca. 25 µl NaOH (1 mol/l) zugegeben. Aus diesen Stammlösungen wurden in PBS bzw. Magermilchlösung oder Konsumvollmilch Verdünnungsreihen zur Erstellung von Standardkurven angefertigt. Sowohl Stammlösungen als auch Gebrauchslösungen wurden an jedem Untersuchungstag frisch hergestellt. Zur Hydrolyse von Penicillin G und Ampicillin wurden die Antibiotika-Stammlösungen (1 mg/ml in Methanol) mit 20 µl NaOH (1 mol/l)/ml versetzt und bei Raumtemperatur 48 h inkubiert.

3.1.3 Puffer und Lösungen

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

2 % Casein-PBS-Lösung (20 g Natriumcaseinat/l PBS)

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

1 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,4)

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

0,9 % Natriumchloridlösung

0,1 mol/l Phosphat-Puffer (pH 6,8)

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)

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

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

Substratlösungen für Meerrettichperoxidase:

- nach GALLATI und PRACHT (1985): 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

- BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) (Roche Diagnostics GmbH, 1582950)

- SuperSignal ELISA Femto (Pierce Chem. Comp., 37075)

- SuperSignal ELISA Pico (Pierce Chem. Comp., 37070)

3.1.4 Immunreagenzien

Monoklonale Antikörper gegen Ampicillin, Cloxacillin, Streptomycin, Sulfadiazin und Sulfamethazin wurden im Rahmen früherer Untersuchungen am Institut entwickelt (MÄRTLBAUER et al., 1994; DIETRICH et al, 1998) und standen für die vorliegende Arbeit als affinitätschromatographisch gereinigte Präparationen zur Verfügung.

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

Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase (DAKO A/S, P 0161)

3.1.5 Probenmaterial

Hemmstofffreie Konsumvollmilch, 3,8 % Fettgehalt, pasteurisiert;

Hemmstoffpositive Anlieferungsmilchproben aus der Untersuchungstätigkeit des Milchprüfings Bayern e.V. (Proben wurden bis zur Untersuchung bei -18°C gelagert, am Tag der Untersuchung im Wasserbad bei 43°C aufgetaut und innerhalb von maximal 2 Tagen untersucht)

3.1.6 Geräte

Thermoblock Beta s.t.a.r., Typ BS25-6z	(Aerene Analytik)
Heizblock 220 V für SNAP beta-laktam-Test	(Grünau Illertissen GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät	(Heidolph GmbH)
Zentrifuge	(Varifuge 3.0R, Haereus-Christ GmbH)
Photometer UV 1602	(Shimadzu)
ELISA-Auto-Reader 400 AT	(SLT Crailsheim)
Flouroskan Ascent FL	(Labsystems GmbH, 5210460)

3.1.7 Sonstige Materialien

BRT-Hemmstofftest

Mikrotiterplatten-Testsystem, Testkeim: *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (gem. § 35 LMBG Methode L 01.01-5; AiM, Analytik in Milch GmbH)

Rezeptorschnelltests

beta-s.t.a.r.25	(Chr. Hansen GmbH, 600897)
SNAP beta-laktam-Test	(Grünau Illertissen GmbH, 06-01916-04)

Enzymimmuntests

Mikrotiterplatten	(Immunoplate, Nunc GmbH, 363452)
Mikrotiterplatten (weiß)	(Immunoplate, Nunc GmbH, 436110)
Dialyseschläuche 6 mm Durchmesser	(Servapor, 44139)
Sephadex-G 25-Säule (PD 10)	(Amersham Pharmacia Biotech AB, 17-0851-01)

3.2 Untersuchungen und Ergebnisse

3.2.1 Entwicklung eines verbesserten gruppenspezifischen Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillinen

Ein enzymimmunologisches Verfahren zum Nachweis von Penicillinen wurde bereits 1995 von LITZ entwickelt. Die Empfindlichkeit dieses polyklonalen Antiserums ermöglichte jedoch nicht die Detektion von Penicillinen in Milch auf MRL-Niveau (USLEBER et al., 1998). Deshalb wurde in Anlehnung an die Arbeiten von LITZ (1995) ein erneuter Versuch unternommen, einen sensitiven Immuntest zum Nachweis der unveränderten Muttersubstanzen der im Hinblick auf EU-Höchstmengenverordnung 2377/90 relevanten Penicilline zu entwickeln.

Die Synthese der Immunreagenzien erfolgte analog der von LITZ (1995) beschriebenen Kopplungsmethoden. Als Hapten wurde wiederum Ampicillin verwendet, welches zum einen für die Immunisierung von Kaninchen über Glutaraldehyd an bovines Serumalbumin gekoppelt wurde, zum anderen mittels Carbodiimid-Methode mit Meerrettichperoxidase markiert wurde. Von sechs immunisierten Kaninchen zeigte nur eines eine ausgeprägte Immunantwort. Die Seren dieses Tieres wurden gesammelt und zur Gewinnung der IgG-Fraktion mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung nach einer von HEBERT et al. (1973) beschriebenen Methode gefällt. Im folgenden wurde mit diesem Antiserum-Pool gearbeitet.

3.2.1.1 Etablierung eines direkten kompetitiven Enzymimmuntests

Prinzipiell konkurrieren beim direkten kompetitiven Verfahren freies und enzymgebundenes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen (EKINS, 1985), wobei der spezifische Antikörper an die Festphase gebunden ist. Das an die Antikörper gebundene Enzymkonjugat führt zu einem Substratumsatz, der umgekehrt proportional zur Antibiotikakonzentration in der Probe ist. Die Inkubation der Reagenzien mit der Festkörperphase erfolgt simultan, nicht gebundene Reaktionspartner werden durch Waschschriffe entfernt.

Zur Durchführung des direkten kompetitiven ELISAs 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 Pencillin G-Standards bzw. Proben und Ampicillin-Enzymkonjugat hinzugegeben (jeweils 50 µl/Kavität) und 2 h bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert. Nach erneutem Waschen und Trockenschlagen erfolgte die Zugabe der Enzymsubstratlösung. Nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 20 min) wurde die Umsetzungsreaktion mit 1 mol/l H₂SO₄ gestoppt und anschließend die Extinktion bei 450 nm photometrisch gemessen.

3.2.1.1.1 Bestimmung der Sensitivität

Zur Ermittlung der im Hinblick auf die Testsensitivität optimalen Kombinationen an Immunreagenzien wurden die im Verlauf der Immunisierung gewonnenen Antiseren gegen enzymmarkiertes Ampicillin titriert (Schachbretttitration). Die Kombinationen aus Antiserum und Enzymkonjugat, die in einen Extinktionswert des antigen-freien Kontrollansatzes (= ohne Zusatz von Antibiotikum) von etwa 1,0 resultierten und dabei für den antibiotikahaltigen (B) und -freien Vergleichsansatz (B₀) einen hohen Extinktionsunterschied (B/B₀) aufwiesen, wurden für die Erstellung von Standardkurven verwendet. Es zeigte sich, dass die höchste Testsensitivität mit Verdünnungen von 1:1000 für den Antiserumpool (Serumabnahmen der 15.-37. Woche nach der Grundimmunisierung) und 1:2000 für das Enzymkonjugat erreicht werden konnte. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit des Verfahrens zum Nachweis von Penicillin G wurden Standardkurven sowohl in Puffer (PBS) als auch in 12 %-, 10 %-, 5 %- und 2,5 %-iger Magermilchlösung (in A. dest. rekonstituiertes Magermilchpulver) in einem Konzentrationsbereich von 200 - 0,09 ng/ml angelegt. Als Maß für die Empfindlichkeit des Testsystems wurde der 50 %-Wert bestimmt, d.h. diejenige Antibiotikumkonzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Antigens an die Antikörper um 50 % reduzierte.

3.2.1.1.2 Bestimmung der Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität des Antiserums wurden Wettbewerbsversuche mit anderen Penicillinen (Muttersubstanzen: Ampicillin-, Amoxicillin-, Oxacillin-, Cloxacillin-, Dicloxacillin-, Nafcillin-, Azlocillin-, Bacampicillin-, Carbenicillin-, Epi-, Meticillin-, Methicillin-, Phenoxymethylpenicillin-, Piperacillin-, Ticarcillin, Penicillin V) und verschiedenen Cephalosporin-Antibiotika (Ceftiofur, Cephacetril, Cephalexin, Cephapirin und Cephazolin) sowie mit den durch alkalische Hydrolyse erzeugten Derivaten von Ampicillin und Penicillin G durchgeführt. Für jede dieser Substanzen wurden Standardkurven in einem Bereich von 10 µg/ml bis 0,01 ng/ml angelegt, die 50 %-Werte bestimmt und unter Berücksichtigung des Molekulargewichts der überprüften Substanzen die relative Kreuzreaktivität nach folgender Formel ermittelt:

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

(R = Referenzantibiotikum Penicillin G; X = Testantibiotikum)

3.2.1.2 Charakteristika des entwickelten gruppenspezifischen Enzymimmuntests

Analog des von LITZ (1995) entwickelten enzymimmunologischen Nachweises von Ampicillin wurde auch in dieser Arbeit ein gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen unter Einsatz einer heterologen Kombination von Antiserum und Enzymkonjugat erstellt. Geringe Matrixeffekte durch Milch konnten durch Verwendung einer 10 %-igen Magermilchlösung ausgeglichen werden. Die Bindung des Ampicillin-Enzymkonjugates an die Antikörper wurde in den Vorversuchen durch freies Penicillin G (200 ng/ml) nahezu vollständig gehemmt. Nach Optimierung des Testverfahrens lag die 50 %-Dosis für Penicillin G bei 2-4 ng/ml, die mittlere Nachweisgrenze bei 0,5-1 ng/ml Penicillin G. Die Intra-Assay-Variationskoeffizienten des ELISAs bewegten sich für Vierfachansätze im Bereich von 2 % bis 7 %. Weitere Standardkurvenparameter für Penicillin G sind Tab. 7 zu entnehmen, eine charakteristische Standardkurve zeigt Abb. 5.

Tabelle 7: Standardkurvenparameter des direkten kompetitiven Enzymimmunoassays für Penicillin G nach Auswertung von 30 Standardkurven

	50%-Dosis (ng/ml)	Nachweisgrenze (ng/ml)
Mittelwert (ng/ml)	3,44	0,62
Standardabweichung (ng/ml)	1,14	0,42
Variationskoeffizient (%)	33,1	67,7
Minimalwert (ng/ml)	0,66	0,19
Maximalwert (ng/ml)	5,62	2,25

Die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität zeigten, dass - wie gewünscht - das Antiserum hohe Kreuzreaktionen mit allen im Hinblick auf die gesetzlichen Bestimmungen relevanten Penicillinen (Ampi-, Amoxi-, Oxa-, Cloxa-, Dicloxa- und Nafcillin) sowie mit einer Reihe weiterer Penicilline aufwies. Dagegen konnten weder die getesteten Cephalosporine noch die entsprechenden Penicilloyl-Derivate in einer Konzentration von bis zu 10 µg/ml nachgewiesen werden (Kreuzreaktionen von < 1 %). Die Ergebnisse, im Vergleich mit dem von USLEBER et al. (1998) beschriebenen Enzymimmuntest, sind in Abb. 6 dargestellt.

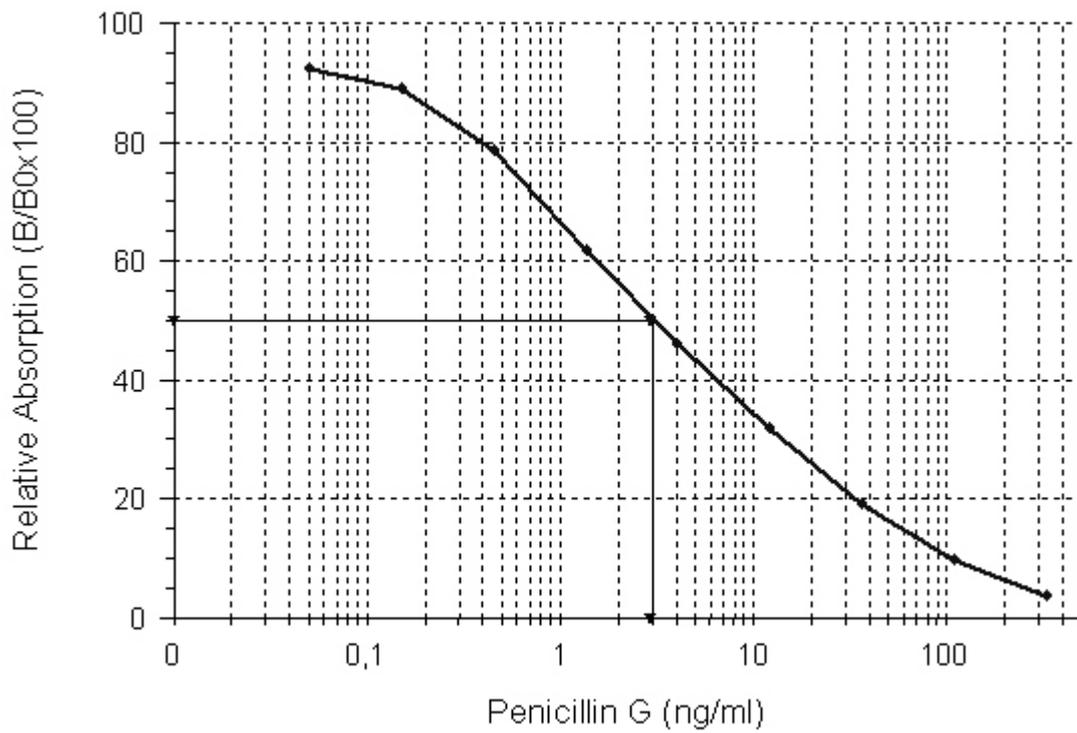


Abbildung 5: Charakteristische Standardkurve für den Nachweis von Penicillin G im direkten kompetitiven Enzymimmuntest. Der Extinktionswert für den antigen-freien Kontrollansatz lag bei 1,0. Die 50 %-Dosis ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

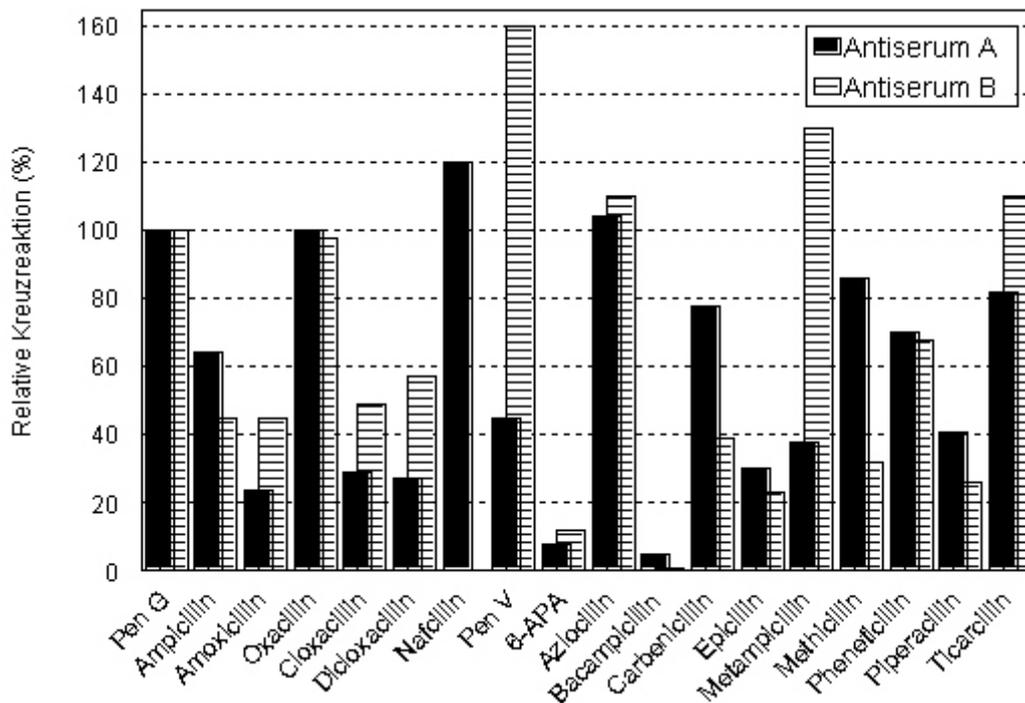


Abbildung 6: Vergleich der relativen Kreuzreaktionen (%) des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Antiserums (Antiserum A) mit dem von USLEBER et al. (1998) beschriebenen Antiserum (Antiserum B; Nafcillin nicht untersucht).

3.2.1.3 Anwendbarkeit des Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillinen

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des entwickelten enzymimmunologischen Nachweisverfahrens wurde pasteurisierte Konsummilch (3,8 % Fett, homogenisiert) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin künstlich kontaminiert. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des quantitativen Penicillin G-Nachweises wurde Milch mit 1, 2, 4, 8, 16, und 32 ng Penicillin G/ml dotiert; die anderen Penicilline, deren Nachweis nur semiquantitativ (als Penicillin G-Äquivalente) erfolgte, wurden in Konzentrationen entsprechend dem einfachen, viertel, halben und doppelten MRL-Wert überprüft. Die Dotierung der Milchproben erfolgte durch Zugabe von 20 µl PBS-Standardlösung auf 1 ml Milch. Vor dem Einsatz in den ELISA wurde die Milch durch Zentrifugieren (2000 x g, 4°C, 15 min) entfettet.

Die künstlich kontaminierten Milchproben wurden in Vierfachansätzen in den direkten simultanen ELISA nach 3.2.1.1 eingesetzt, als Negativkontrolle wurde stets eine Antibiotikafreie Milchprobe mituntersucht. Die entsprechenden Penicillin G-Standardkurven und Probenverdünnungen wurden in 10 %-iger Magermilchlösung angefertigt. Für jede Substanz erfolgte eine mindestens dreimalige Überprüfung an unterschiedlichen Tagen.

Vorversuche zeigten, dass zur Vermeidung unspezifischer Matrixeffekte die Milchproben entfettet und Verdünnungen in 10 %-iger Magermilchlösung angelegt werden mußten. Die Wiederfindungsraten für Penicillin G lagen im untersuchten Dotierungsbereich zwischen 88,5 und 114 %, die Variationskoeffizienten betrugten 30 % bis 40 % (Tab. 8). Die relative Hemmung des Testsystems durch Penicillin G, Ampicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin lag bereits beim halben MRL-Wert über 20 %, Amoxicillin zeigte eine entsprechende Hemmung erst ab 4 ng/ml (Abb. 7). Die Nachweisgrenze - definiert als die Antigenkonzentration, die im Testsystem zu einer 20 %-igen Hemmung des Substratumsatzes (B/B0) führte - lag somit für Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin auf oder unterhalb der nach VO (EWG) 2377/90 festgelegten Höchstwerte und gewährt die Nachweisbarkeit für alle mit einem MRL-Wert belegten Penicilline innerhalb des gesetzlich festgelegten Rahmens mit dem gruppenspezifischen ELISA (Tab. 9).

Tabelle 8: Wiederfindungsraten für Penicillin G in künstlich kontaminierten Milchproben

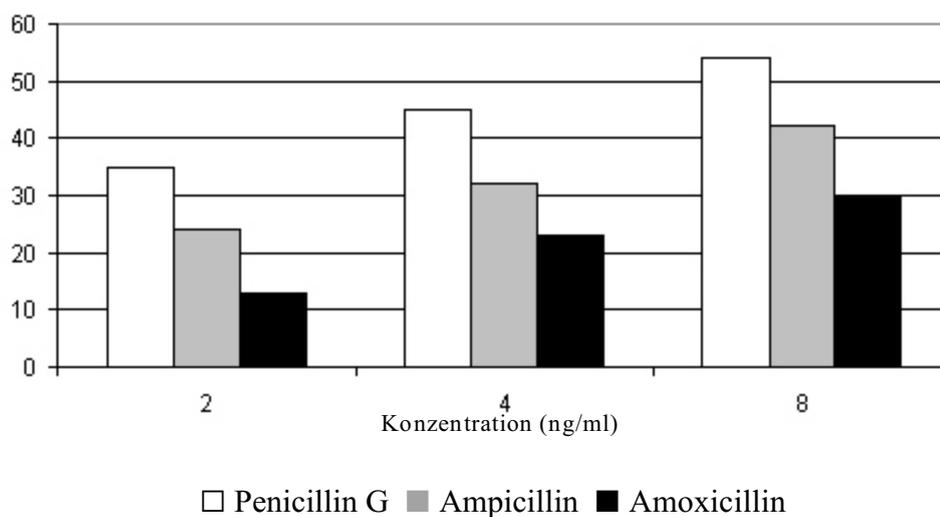
Penicillin G-Zusatz (ng/ml)	Meßergebnisse im Enzymimmuntest für Penicilline				
	Mittelwert ng/ml	s ng/ml	VK %	Wiederfindung %	n
1	1,14	0,38	33,3	114	7
2	1,85	0,80	43,2	92,5	13
4	3,54	1,33	37,6	88,5	13
8	7,15	2,19	30,6	89,4	13
16	15,5	4,32	27,9	96,9	11
32	29,6	5,50	18,6	92,5	6

Tabelle 9: Nachweisbarkeit für sieben nach VO (EWG) 2377/90 mit MRL-Werten belegte Penicilline mit dem gruppenspezifischen ELISA

Substanz	MRL (ng/ml)	Niedrigste nachweisbare Konzentration (ng/ml) in Milch*
Penicillin G	4	1
Ampicillin	4	2
Amoxicillin	4	4
Oxacillin	30	2
Cloxacillin	30	4
Dicloxacillin	30	6
Nafcillin	30	3

* Konzentration, die in allen Wiederfindungs-Experimenten einen Absorptionswert von $\leq 80\%$ B/B₀ ergab.

A



B

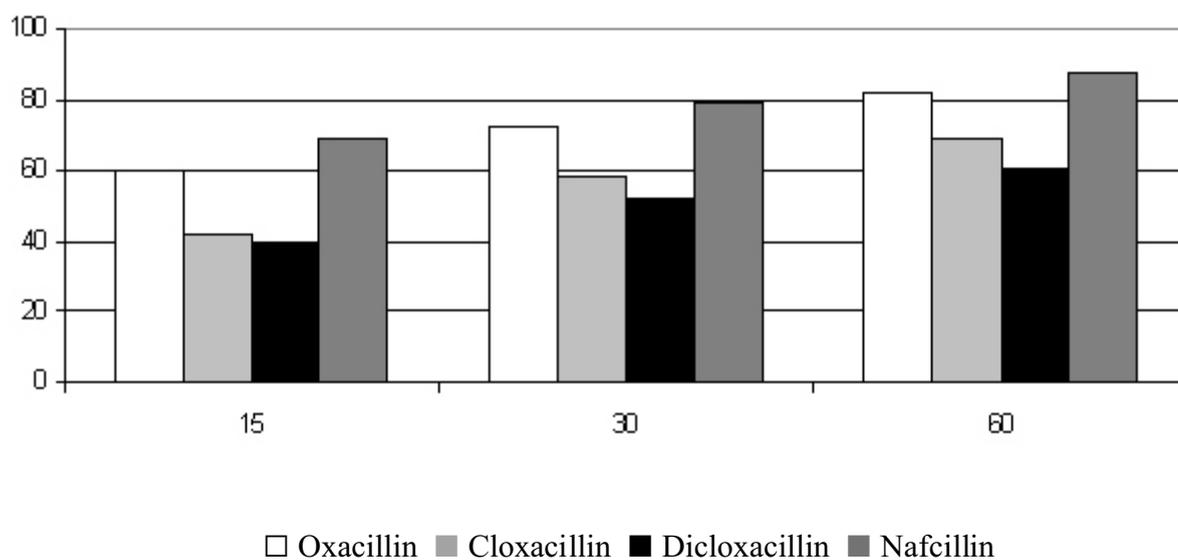


Abbildung 7: *Relative Hemmung (in %) des Testsystems zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen bei Untersuchung von dotierten Milchproben:*
 A) *Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin*
 B) *Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nafcillin*

3.2.2 Entwicklung indirekter Enzymimmunoassays zum Nachweis einiger Antiinfektiva

Im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes, das die Entwicklung eines Biosensors zum parallelen Nachweis von verschiedenen Antiinfektiva in Milch zum Ziel hatte ("Entwicklung eines miniaturisierten Biosensors zur Sicherung der Produktqualität in milchverarbeitenden Betrieben"; Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.; FEI) mußten bereits früher entwickelte Enzymimmuntests zum Nachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Ampicillin (MÄRTLBAUER et al., 1994; DIETRICH et al., 1998) bzw. der unter 3.2.1 beschriebene ELISA für Penicillin G auf ein indirektes kompetitives Testformat umgestellt werden. Neben einem einheitlichen Detektionsschritt bieten indirekte Verfahren insbesondere hinsichtlich der Erstellung robuster Biochips substantielle Vorteile gegenüber direkten Assays. Prinzipiell konkurrieren hierbei immobilisierter Analyt (Festphasenantigen) und freier Analyt (z.B. Antiinfektiva in einer Milchprobe) um eine begrenzte Anzahl Antikörperbindungsstellen. An die Festphase gebundene Antikörper werden danach über einen zweiten enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen. Die Meßgröße ist somit der gebundene markierte Antikörper, wobei während der Enzym-Substrat-Reaktion der Substratumsatz um so geringer ist, je mehr Analytmoleküle in der Probe waren und Antikörperbindungsstellen besetzt haben. Für die Herstellung der Festphasenantigene wurden für die jeweiligen Antiinfektiva verschiedene Trägerproteine sowie ein breites Spektrum unterschiedlicher Kopplungsmethoden angewendet, um insbesondere bei der beabsichtigten Etablierung eines Microarraysystems auf eine breite Palette unterschiedlicher Immunreagenzien zurückgreifen zu können.

3.2.2.1 Herstellung der Festphasenantigene

Zur Etablierung kompetitiver indirekter Testverfahren mußten Festphasenantigene aus den jeweiligen Zielantibiotika und Trägerproteinen synthetisiert werden, wobei - soweit möglich - verschiedene Kopplungsmethoden zur Anwendung kommen sollten. Da in einigen Analyt-Molekülen (z.B. Streptomycin) keine reaktiven Gruppen vorhanden sind, die zur direkten Kopplung an einen Proteinträger verwendet werden können, mußten diese Substanzen zunächst derivatisiert werden.

3.2.2.1.1 Derivatisierungen

Streptomycin, Sulfadiazin und Sulfamethazin wurden mittels verschiedener Methoden derivatisiert. Details zu den durchgeführten Derivatisierungen sind Tab. 10 zu entnehmen.

Derivatisierung von Streptomycin mit 4-Aminobenzoesäurehydrazid

Streptomycin wurde mit 4-Aminobenzoesäurehydrazid (ABH) zu einem Streptomycin-Hydrazon derivatisiert. Die Umsetzung erfolgte als nucleophile Addition der primären Aminogruppe des ABH an die Aldehydgruppe des Streptomycins, so dass das Derivat eine zur Kopplung an Proteine geeignete primäre aromatische Aminogruppe aufweist. In Abb. 8 ist das Reaktionsschema dargestellt.

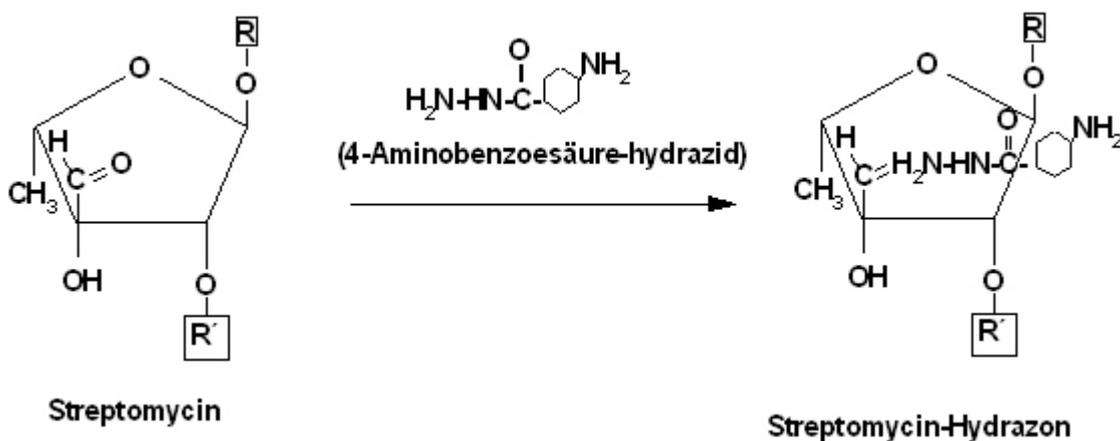


Abbildung 8: Derivatisierung von Streptomycin mit 4-Aminobenzoesäurehydrazid zu einem Streptomycin-Hydrazon ($R = \text{Streptidin}$, $R' = N\text{-methyl-}l\text{-glucosamin}$).

Derivatisierung von Streptomycin mit Carboxymethoxylamin

Bei dieser Reaktion wird die primäre Aminogruppe des Carboxymethoxylamins in einer nucleophilen Additionsreaktion an die Aldehydgruppe des Streptomycins gebunden, wonach das Reaktionsprodukt, ein Streptomycin-Oxim, eine reaktive Carboxylgruppe aufweist. Das Reaktionsschema zeigt Abb. 9.

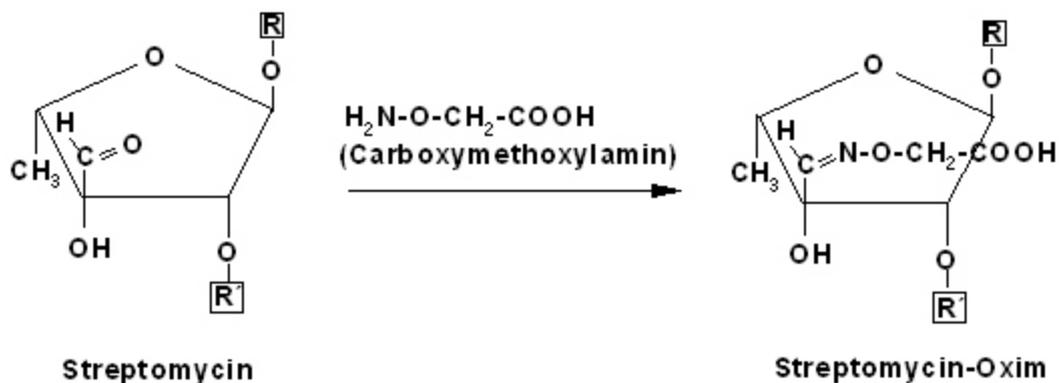


Abbildung 9: Derivatisierung von Streptomycin mit Carboxymethoxylamin zu einem Streptomycin-Oxim ($R = \text{Streptidin}$, $R' = N\text{-methyl-l-glucosamin}$).

Derivatisierung von Sulfadiazin und Sulfamethazin mit Bernsteinsäure-Anhydrid

Sulfadiazin und Sulfamethazin wurden mit Bernsteinsäure-Anhydrid derivatisiert. Dabei reagiert Bernsteinsäure-Anhydrid unter Öffnung seiner zyklischen Struktur mit der aromatischen Aminogruppe des Sulfonamids. Dadurch wird eine terminale Carboxylgruppe eingeführt, über die wiederum das Sulfonamid an ein Protein gekoppelt werden kann. Das Reaktionsschema ist in Abb. 10 dargestellt. Reines Sulfonamid-Hemisuccinat konnte nach Kristallisation des Reaktionsproduktes in Ethanol:Wasser (6:4,5; v:v) bei -20°C gewonnen werden.

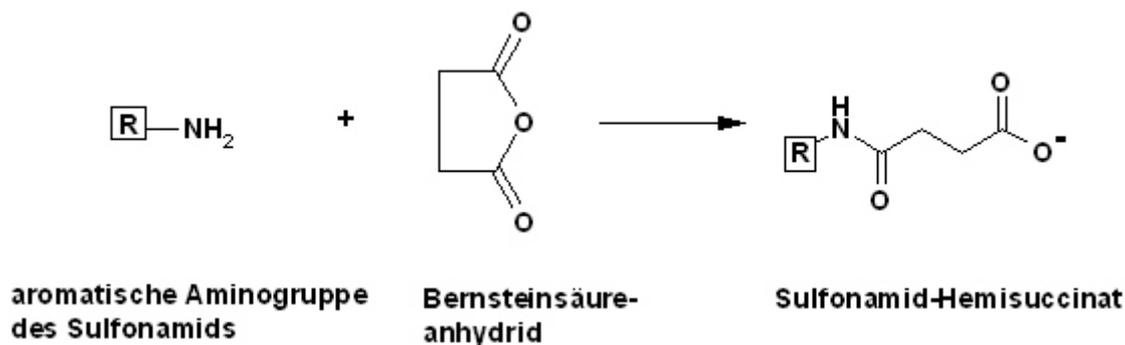


Abbildung 10: Derivatisierung von Sulfadiazin und Sulfamethazin mit Bernsteinsäureanhydrid zu einem Hemisuccinat ($R = \text{Sulfonamid}$).

Tabelle 10: Typische Reaktionsansätze zur Derivatisierung von Streptomycin, Sulfadiazin und Sulfamethazin

Substanz	Menge (mg)	Reagenz	Menge (mg)	Temp. (°C)	Zeit (h)	Zusätze	Lösungsmittel (Vol.)
Streptomycin	816	Carboxymethoxylamin	602	20	24	Na-Acetat: 8,2 mg	A. dest. (1,7 ml)
Streptomycin	200	4-Aminobenzoesäurehydrazid	2	60	13	Na-Acetat: 3,9 mg	A. dest. (0,625 ml)
Sulfadiazin	1000	Bernsteinsäureanhydrid	500	ca. 77	1,5		A) getr. Aceton + getr. Pyridin (10 ml + 10 µl)
				ca. 82	0,5		B) Ethanol + Wasser (6 ml + 4,5 ml)
Sulfamethazin	1000	Bernsteinsäureanhydrid	500	ca. 77	1,5		A) getr. Aceton + getr. Pyridin (10 ml + 10 µl)
				ca. 82	0,5		B) Ethanol + Wasser (6 ml + 4,5 ml)

3.2.2.1.2 Kopplungsverfahren

Zur Herstellung der Protein-Antigen-Konjugate zur Beschichtung von Mikrotiterplatten wurden verschiedene Kopplungsverfahren angewendet, sowie verschiedene Trägerproteine eingesetzt (Glukoseoxidase, GlcOx; Ovalbumin, OVA; β -Casein).

Kopplung mittels Natriumperjodatmethode

Mittels der zweistufigen Natriumperjodatmethode nach WILSON und NAKANE (1978) wurden Streptomycin-Hydrazon, Sulfadiazin und Sulfamethazin sowie Ampicillin an Glukoseoxidase gekoppelt.

Zur Oxidation des Kohlenhydratanteils des Trägerproteins mittels Perjodat wurde Glukoseoxidase (gelöst in A. dest.) mit 0,1 mol/l Natriumperjodatlösung versetzt und 20 min unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über Nacht gegen 1 mmol/l Natriumacetat-Puffer (pH 4,4; 5 l; 4°C) dialysiert. Die entstandenen reaktiven Aldehydgruppen reagieren in einem zweiten Schritt mit der primären aromatischen Aminogruppe der jeweiligen Antibiotika unter Ausbildung einer Schiff'schen Base. Nach Zugabe des jeweiligen Haptens wurde der Ansatz mittels Carbonatpuffer auf einen pH-Wert von 9,5 bzw. 7,5 (Ampicillin-Ansatz) eingestellt und für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurde zur Reduktion der Schiff'schen Basen Natriumborhydrid zugegeben und 1,5 h bei 4°C unter Lichtausschluß inkubiert. Zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen und überschüssigem Kopplungsreagenz wurde das Kopplungsprodukt anschließend gegen PBS (pH 7,2) dialysiert (3 x 5 l). In Tab. 11 sind die eingesetzten Mengen der Reagenzien und die Volumina der Lösungsmittel zusammengefaßt.

Kopplung mittels Carbodiimidmethode

Mittels wasserlöslichem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid, EDPC) wurden Streptomycin-Oxim, die derivatisierten Sulfonamide (Sulfadiazin-HS und Sulfamethazin-HS) sowie die Penicilline Ampicillin, Epicillin und Metampicillin an unterschiedliche Trägerproteine (GlcOx, OVA und β -Casein) gekoppelt. Bei dieser einstufigen Reaktion entstehen an den Carboxylgruppen der Antibiotika durch das im Überschuß zugegebene Carbodiimid O-Acylisoharnstoffe, die mit freien Aminogruppen der Proteine unter Bildung eines Amids und eines Harnstoffderivates reagieren (WONG, 1993).

Bei den Kopplungen wurde ein molares Verhältnis von Antibiotikum zu Protein von 100:1 bzw. 150:1 (Streptomycin) sowie 50:1 und 10:1 (für Ampicillin) eingehalten. In einem typischen Reaktionsansatz wurden das Antibiotikum und EDPC im Überschuß gelöst und zu der Proteinlösung gegeben. Nach einer 20 stündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß erfolgte zur Abtrennung von nicht gebundenem Antibiotikum sowie von überschüssigem Kopplungsreagenz eine Dialyse der Kopplungsprodukte bei 4°C gegen 3 x 5 l PBS. Die Mengen der verwendeten Reagenzien und die Volumina der Lösungsmittel sind in Tab. 11 dargestellt.

Kopplung mittels Carbonyldiimidazol

Mit Hilfe dieses Kopplungsreagenzes wurden Ampicillin und Sulfadiazin an Glukoseoxidase und/oder Ovalbumin gekoppelt. 1,1'-Carbonyldiimidazole reagiert mit Carboxyl- und Hydroxylgruppen unter Bildung reaktiver N-acylimidazol-Intermediärprodukte, welche wiederum in einer nukleophilen Additionsreaktion mit Aminogruppen von Proteinen Amidbindungen eingehen.

Das Antibiotikum und Carbonyldiimidazol wurden in getrocknetem Aceton 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der wässrigen Proteinlösung erfolgte eine 24 stündige Inkubation bei 4°C, anschließend wurde das Kopplungsprodukt 3 x gegen 5 l PBS dialysiert. Die Mengen und Volumina der verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel finden sich in Tab. 11.

Kopplung mittels aktiver Estermethode

Mit der aktiven Estermethode wurde Cloxacillin an Glukoseoxidase gekoppelt. Unter Vermittlung von Dicyclohexylcarbodiimid entsteht zunächst durch Reaktion der Carboxylgruppe des Cloxacillins mit N-Hydroxysuccinimid in wasserfreiem Medium ein als aktiver Ester bezeichnetes Intermediärprodukt. In einem zweiten Schritt bindet sich das Antibiotikum in wäßrigem Medium unter Spaltung des Esters kovalent an die freien Aminogruppen des Proteins (ANDERSON et al., 1964; KITAGAWA et al., 1981). Dieser Kopplungsansatz wurde analog der von USLEBER et al. (1994) beschriebenen Methode durchgeführt und diente der Ergänzung des bereits vorhandenen Cloxacillin-GlcOx-Konjugates. Die verwendeten Mengen der Reagenzien sowie Reaktionsvolumina sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Kopplung von Antibiotika und Sulfonamiden an Proteine

Antibiotikum	Menge (mg)	Lösungsmittel	ml	Protein	Menge (mg)	Lösungsmittel und Zusätze	ml
<i><u>Carbodiimid-Methode (EDPC)</u></i>							
Ampicillin (Ampi:OVA 100:1)	7,85	A. dest.	1,96	OVA	10	A. dest. EDPC (4,3 mg in A. dest.)	0,65 0,2
Ampicillin (Ampi:GlcOx 100:1)	1,88	A. dest.	0,47	GlcOx	10	A. dest. EDPC (1,04 mg in A. dest.)	0,65 0,047
Ampicillin (Ampi:OVA 50:1)	3,93	A. dest.	0,98	OVA	10	A. dest. EDPC (2,16 mg in A. dest.)	0,65 0,098
Ampicillin (Ampi:GlcOx 50:1)	1,92	A. dest.	0,48	GlcOx	20	A. dest. EDPC (1,05 mg in A. dest.)	1,3 0,048
Ampicillin (Ampi:OVA 10:1)	0,78	A. dest.	0,2	OVA	10	A. dest. EDPC (0,4 mg in A. dest.)	0,65 0,02
Ampicillin (Ampi:GlcOx 10:1)	0,19	A. dest.	0,05	GlcOx	10	A. dest. EDPC (0,1 mg in A. dest.)	0,65 0,005
Ampicillin (Ampi:β-Casein 50:1)	7,28	A. dest.	1,8	β-Casein	10	A. dest. EDPC (4 mg in A. dest.)	0,65 0,18
Epicillin	2	A. dest.	2,5	GlcOx	10	A. dest. EDPC (1 mg in A. dest.)	0,75 0,25
Metampicillin	2	A. dest.	2,5	GlcOx	10	A. dest. EDPC (1 mg in A. dest.)	0,75 0,25

Fortsetzung Tabelle 11:

Antibiotikum	Menge (mg)	Lösungsmittel	ml	Protein	Menge (mg)	Lösungsmittel und Zusätze	ml
Streptomycin/-Oxim	5,3	Ethanol/Wasser (1+4)	4	GlcOx	10	A. dest. EDPC (300 mg)	1
	15	Ethanol/Wasser (1+4)	4	OVA	6,8	A. dest. EDPC (300 mg)	1
	10	Ethanol/Wasser (1+4)	4	β -Casein	2,5	A. dest. EDPC (300 mg)	1
Sulfadiazin-HS	2	Tris-Puffer: Dioxan (1:1)	0,4	GlcOx	10	PBS (1:20 in A. dest. verdünnt) EDPC (1 mg)	0,5
Sulfamethazin-HS	2	Tris-Puffer: Dioxan (1:1)	0,4	GlcOx	10	PBS (1:20 in A. dest. verdünnt) EDPC (1 mg)	0,5
<i><u>Carbodiimid-Methode</u></i> <i>(Carbonyldiimidazol)</i>							
Ampicillin	2	getr. Aceton	0,8	GlcOx	10	A. dest. Carbonyldiimidazol (16 mg)	0,42
Ampicillin	5	getr. Aceton	0,8	OVA	5,8	Na-Bicarbonatpuffer Carbonyldiimidazol (40 mg)	0,385
Sulfadiazin	5	getr. Aceton	0,8	OVA	5,8	Na-Bicarbonatpuffer Carbonyldiimidazol (40 mg)	0,385

Fortsetzung Tabelle 11:

Antibiotikum	Menge (mg)	Lösungsmittel	ml	Protein	Menge (mg)	Lösungsmittel und Zusätze	ml
<i>Perjodatmethode</i>							
Ampicillin	5	PBS	0,5	GlcOx	5	A. dest. NaJO ₄ (0,1 mol/l) Bicarbonatpuffer NaBH ₄ in A. dest.	0,8 0,366 0,2 0,1
Streptomycin/-ABH	200	A. dest.	0,625	GlcOx	15	A. dest. NaJO ₄ (0,1 mol/l) NaOH (1 mol/l) HCl (1 mol/l) NaBH ₄ in A. dest.	3,75 0,75 0,24 0,02 0,2
Sulfadiazin	10			GlcOx	4,9	A. dest. NaJO ₄ (0,1 mol/l) Bicarbonatpuffer NaOH (1 mol/l) HCl (1 mol/l) NaBH ₄ in A. dest.	1,2 0,24 0,23 0,05 0,01 0,1
Sulfadiazin	20			GlcOx	2	A. dest. NaJO ₄ (0,1 mol/l) NaOH (1 mol/l) NaBH ₄ in A. dest.	4 0,8 0,075 0,15

Fortsetzung Tabelle 11:

Antibiotikum	Menge (mg)	Lösungsmittel	ml	Protein	Menge (mg)	Lösungsmittel und Zusätze	ml
Sulfamethazin	10			GlcOx	4,9	A. dest. NaJO ₄ (0,1 mol/l) Bicarbonatpuffer NaOH (1 mol/l) HCl (1 mol/l) NaBH ₄ in A. dest.	1,2 0,24 0,23 0,05 0,01 0,1
Sulfamethazin	20			GlcOx	2	A. dest. NaJO ₄ (0,1 mol/l) Bicarbonatpuffer NaOH (1 mol/l) HCl (1 mol/l) NaBH ₄ in A. dest.	4 0,8 0,02 0,103 0,041 0,15
<i><u>Aktive Estermethode</u></i>							
Cloxacillin	24,6	DMF	1	GlcOx	10	NaHCO ₃ (0,13 mol/l) N-Hydroxysuccinimid (30,9 mg) DCC (110,6 mg)	2

3.2.2.1.3 Kopplungsansätze

Zur Einführung geeigneter funktioneller Gruppen zur Kopplung an Proteine wurden Streptomycin, Sulfadiazin und Sulfamethazin mittels verschiedener Methoden derivatisiert. Die Modifikation von Streptomycin erfolgte in Anlehnung an SCHNAPPINGER (1992), die der Sulfonamide nach HAASNOOT et al. (2000). Auf eine Trennung zwischen freien und derivatisierten Antigenen wurde verzichtet, da freie Analyten die Kopplung der Derivate aufgrund der gewählten Kopplungsmethoden nicht beeinträchtigen.

Für die Synthese der Festphasenantigene wurden für jedes Antiinfektivum verschiedene Kopplungsmethoden angewendet sowie verschiedene Trägerproteine getestet. In Tab. 12 sind die Kopplungsansätze mit den eingesetzten molaren Verhältnissen (Hapten:Protein) zusammengefaßt. Aufgrund eines fehlenden UV-Spektrums der meisten Antiinfektiva wurde auf einen photometrischen Nachweis der Kopplungen sowie eine Bestimmung der Kopplungsrate verzichtet. Die Überprüfung der synthetisierten Festphasenantigene erfolgte statt dessen mittels der bereits charakterisierten Antikörper, wobei besonderes Augenmerk auf Parameter wie Sensitivität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und Stabilität der Hapten-Protein-Konjugate gelegt wurde. Prinzipiell ermöglichten alle synthetisierte Festphasenantigene den Nachweis der entsprechenden Antiinfektiva, jedoch mußten die verschiedenen Konjugate zum Erreichen einer ausreichenden Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes (B0) in stark unterschiedlichen Arbeitskonzentrationen in die ELISAs eingesetzt werden. In Abhängigkeit vom verwendeten Beschichtungsantigen wurden des weiteren auch insbesondere beim Penicillin-Nachweis stark variierende Sensitivitätsunterschiede zwischen den jeweiligen Enzymimmuntests beobachtet. Standardkurven zu den hergestellten Beschichtungsantigenen finden sich in den Abb. 11-16. Gute Ergebnisse konnten mit Glukoseoxidase-Hapten-Konjugaten als Beschichtungsantigen erzielt werden. Die Kohlenhydrat- und Amino-Anteile des Proteins ermöglichen die Anwendung vielseitiger Kopplungsmethoden (z.B. reduzierende Alkylierung mit Perjodat und Kopplung an Streptomycin-ABH oder Amidbindung durch EDPC oder DCC an SMA oder Cloxacillin). Weiterhin zeichnete sich GlcOx neben hervorragenden Bindungseigenschaften an die Mikrotiter-platten durch hohe Stabilität und Robustheit aus. Zur Etablierung sensitiver Enzymimmuntests waren für alle Nachweissysteme Immunreagenzien-Konzentrationen im ng-Bereich ausreichend (Tab. 13).

Tabelle 12: Übersicht zur Kopplung von Antibiotika und Sulfonamiden an Proteine - Herstellung der Festphasenantigene

Substanz	Derivat	Trägerprotein¹	Kopplungsmethode	mol Protein: mol Analyt	Proteingehalt der Konjugate (mg/ml)
Penicilline	Cloxacillin	GlcOx	aktiver Ester	1:100	2,5
	Ampicillin	GlcOx	Carbodiimid	1:100; 1:50; 1:10	10; 10; 8,7
	Ampicillin	OVA	Carbodiimid	1:100; 1:50; 1:10	4,0; 4,5; 9,4
	Ampicillin	β-Casein	Carbodiimid	1:100	3,2
	Ampicillin	GlcOx	Perjodat	1:500	1,6
	Ampicillin	GlcOx	Carbonyldiimidazol	1:100	5,5
	Ampicillin	OVA	Carbonyldiimidazol	1:100	2,6
	Epicillin	GlcOx	Carbodiimid	1:100	2,6
	Metampicillin	GlcOx	Carbodiimid	1:100	2,9
Streptomycin	-Hydrazon	GlcOx	Perjodat	1:4500	2,1
	-Oxim	GlcOx	Carbodiimid	1:150	1,4
	-Oxim	OVA	Carbodiimid	1:150	1,0
	-Oxim	β-Casein	Carbodiimid	1:150	0,3
Sulfadiazin	Sulfadiazin	GlcOx	Perjodat	1:2000 (Ansatz 1)	3,2
	Sulfadiazin	GlcOx	Perjodat	1:8000 (Ansatz 2)	0,6
	-Hemisuccinat	GlcOx	Carbodiimid	1:100	6,7
	Sulfadiazin	OVA	Carbonyldiimidazol	1:100	2,8
Sulfamethazin	Sulfamethazin	GlcOx	Perjodat	1:2000 (Ansatz 1)	2,6
	Sulfamethazin	GlcOx	Perjodat	1:7000 (Ansatz 2)	0,6
	-Hemisuccinat	GlcOx	Carbodiimid	1:100	3,9

¹GlcOx = Glukoseoxidase; OVA = Ovalbumin

3.2.2.2 Etablierung indirekter kompetitiver Enzymimmuntests zum Einzelnachweis einiger Antibiotika und Sulfonamide

3.2.2.2.1 Prinzip indirekter kompetitiver Enzymimmuntests

Zur Durchführung der indirekten kompetitiven Enzymimmuntests wurden zunächst Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen Coating-Antigen (in 0,01 mol/l PBS, 100 µl/Kavität) beschichtet und 20 h bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Bindungsstellen mit 2%-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt, anschließend die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und erneut ausgeschlagen. Daraufhin wurden im Vierfachansatz gleichzeitig Antibiotika-Standards bzw. Proben (50 µl/Kavität, Verdünnung in PBS bzw. Milch) und entsprechende Antikörper (50 µl/Kavität, Verdünnung in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung) 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer unter leichter Bewegung inkubiert. Ungebundene Reaktionspartner wurden nachfolgend durch einen Waschschrift entfernt, die Platten ausgeschlagen und zum Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörper Anti-Maus-IgG-Peroxidase bzw. Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase (1:3000 in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung, 100 µl/ Kavität) zugegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend wiederum 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Substratlösung zugegeben (100 µl/Kavität) und die entstehende Farbreaktion nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 20 min) mit 1 mol/l H₂SO₄ (100 µl/Kavität) gestoppt. Anschließend wurde die Ex-tinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und nach dem von MÄRTLBAUER (1993) beschriebenen Verfahren ausgewertet.

3.2.2.2.2 Bestimmung der Sensitivität für die einzelnen Testsysteme

Alle in 3.2.2.1 beschriebenen Festphasenantigene wurden zur Erstellung von indirekten ELISAs verwendet, wobei im Hinblick auf die Anwendbarkeit alle Testsysteme sowohl für die Untersuchung von wässrigen Lösungen (PBS) als auch für Milch optimiert wurden. Für den sensitiven Nachweis der jeweiligen Antibiotika und Sulfonamide wurden, wie in 3.2.1.1.1 beschrieben, zunächst die optimalen Kombinationen der Konzentrationen aus Festphasenantigenen und Antikörpern mittels einer sog. Schachbretttitration ermittelt, wobei entweder PBS

oder Milch als Verdünnungslösungen eingesetzt wurden. Mit den so ermittelten Kombinationen wurden zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Testsysteme Standardkurven in PBS und in Vollmilch erstellt. Als Maß für die Sensitivität der verschiedenen Tests wurden die 50 %-Werte herangezogen, d.h. die Antibiotikum-Konzentrationen, die die Bindung der Antikörper an das Festphasenantigen um 50 % reduzieren.

In orientierenden Versuchen wurden zusätzlich verschiedene kommerziell erhältliche Chemilumineszenz-Substrate der Firmen Pierce (SuperSignal ELISA Pico und Femto) und Roche (BM Chemiluminescence ELISA Substrate) für den Nachweis von Penicillin G unter Verwendung des Antiserums im indirekten Testformat überprüft. Chemilumineszierende Substrate basieren auf der Oxidation von Luminol unter Freisetzung von Licht. Wiederum wurden mittels Schachbretttitration die optimale Kombination aus Festphasenantigen (Ampicillin-GlcOx und -OVA, Kopplungsverhältnis 1:50) und Antiserumverdünnung ermittelt und nachfolgend Standardkurven für Penicillin G in PBS erstellt.

3.2.2.2.3 Bestimmung der Spezifität der einzelnen Testsysteme

Zur Bestimmung der Spezifität der indirekten ELISAs zum Nachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Cloxacillin, Ampicillin und dem gruppenspezifischen Test zum Nachweis von Penicillinen wurden Kompetitionsversuche mit anderen jeweils strukturähnlichen Antibiotika bzw. Sulfonamiden durchgeführt. Die verwendeten Testreagenzien sind in Tab. 13 aufgeführt.

Für die in den Tab. 14-19 angegebenen Substanzen wurden Standardkurven in Konzentrationsbereichen von 0,23 ng/ml bis 10 µg/ml in PBS und Vollmilch angefertigt. Als Maß für die Kreuzreaktionen wurden für die jeweiligen Analyte die 50 %-Werte bestimmt. Die Berechnung der relativen Kreuzreaktionen erfolgte wie in 3.2.1.1.2 beschrieben.

3.2.2.2.4 Charakteristika der optimierten Verfahren

Für den sensitiven Nachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Cloxacillin, Ampicillin und Penicillin G wurden zunächst für jedes Testsystem die optimalen Kombinationen der Konzentrationen aus Festphasenantigenen und Antikörpern bzw. Antiserum ermittelt und Standardkurven in PBS und Konsumvollmilch erstellt. Anhand der 50 %-Werte wurde die Test-Sensitivität bestimmt. Der Einsatz von Milch zur Erstellung der Standardkurven rief in keinem der Testsysteme unerwünschte Matrixeffekte hervor, Milch konnte daher direkt ohne Vorbehandlung in die indirekten Assays eingesetzt werden. Prinzipiell mußten aber bei dem direkten Einsatz von Milch im Testsystem höhere Antikörper-Konzentrationen eingesetzt werden, während die optimalen Arbeitskonzentrationen der Festphasenantigene im Vergleich zu den in Puffer durchgeführten ELISAs nahezu unverändert blieben (Tab. 13). Die Intra-Assay-Variationskoeffizienten lagen zwischen 2 % und 7 %. Unabhängig von den verwendeten Festphasenantigenen konnten mit Ausnahme einiger Penicilline alle getesteten Antibiotika und Sulfonamide sowohl in PBS als auch in Milch im unteren ppb-Bereich quantitativ nachgewiesen werden. Optimale Ergebnisse konnten mit GlcOx als Trägerprotein für alle Nachweissysteme erzielt werden, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Tests ermöglicht wurde. Tab. 13 stellt die Antikörper- und Antigen-GlcOx-Konzentrationen für den Nachweis in PBS und in Milch gegenüber, in Tab. 20 sind die MRL-Werte für die jeweiligen Antiinfektiva sowie die Nachweisgrenzen der optimierten Testsysteme dargestellt. Die Abb. 11-16 zeigen die erhaltenen Standardkurven zu den jeweiligen indirekten ELISAs.

Beim Nachweis von **Streptomycin** in indirektem Testformat zeigte sich, dass bei Verwendung des Coating-Antigens Streptomycin-ABH-GlcOx sowohl die höchste Empfindlichkeit als auch die beste Reproduzierbarkeit des Testsystems erzielt werden konnte (Abb. 11). Bei einem Meßbereich von 1,6 bis 400 ng/ml lag die Nachweisgrenze dieses Testsystems für Streptomycin bei 2 ng/ml. Durch die hohe relative Kreuzreaktion ist auch das strukturverwandte Dihydrostreptomycin gleichermaßen weit unterhalb des festgesetzten Höchstwertes von 200 ng/ml nachweisbar.

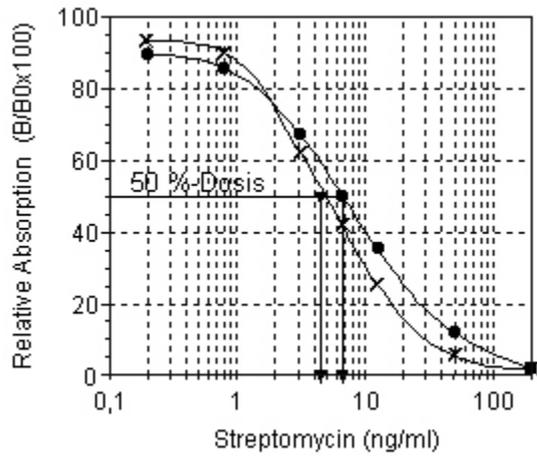
Tabelle 13: Verwendete Immunreagenzien-Konzentrationen zum optimierten Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in PBS und Milch mittels indirektem ELISA

Nachweis von	Immunreagenzien-Konzentrationen					
	Antikörper	Beschichtungs-Antigen				
		Bezeichnung	ng/ml für Nachweis in		Bezeichnung	ng/ml für Nachweis in
		PBS	Milch		PBS	Milch
Streptomycin	4E2	35	150	Streptomycin-ABH-GlcOx	300	300
Sulfadiazin	2G6	30	250	SDA-GlcOx (Ansatz 2)	500	250
Sulfamethazin	4D9	100	400	SMA-HS-GlcOx	300	500
Cloxacillin	1F7	30	70	Cloxacillin-GlcOx	500	500
Ampicillin	3B5	300	1600	Epicillin-GlcOx	750	650
Penicillin G	polyklonales Antiserum	1:1000	1:2000	Ampicillin-GlcOx (Koppl.verh. 1:50)	50	150

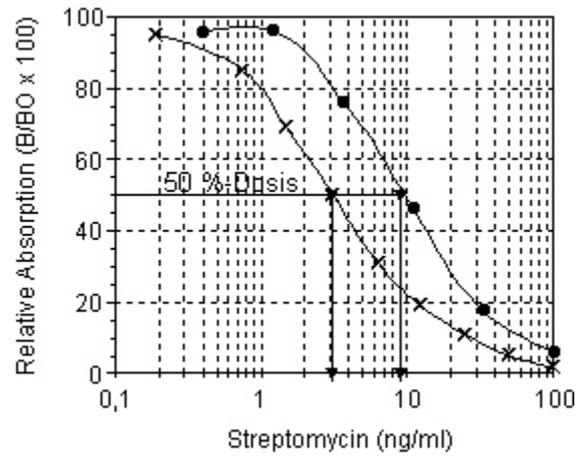
Tabelle 14: Relative Kreuzreaktion (KR) des Streptomycin-Antikörpers mit Dihydrostreptomycin in PBS bzw. Milch unter Verwendung von Streptomycin-ABH-GlcOx als Festphasenantigen

Substanz	MG	Standardkurve in	50 % (ng/ml)	KR (%)
Streptomycin	581,6	PBS	2,3	100
		Milch	9,5	100
Dihydrostreptomycin	583,6	PBS	3,10	80,0
		Milch	12,1	76,2

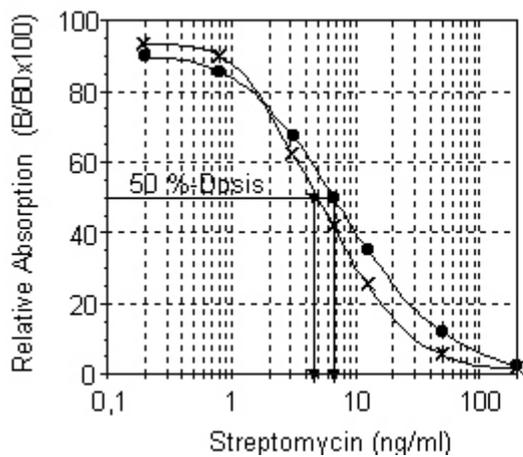
A



B



C



D

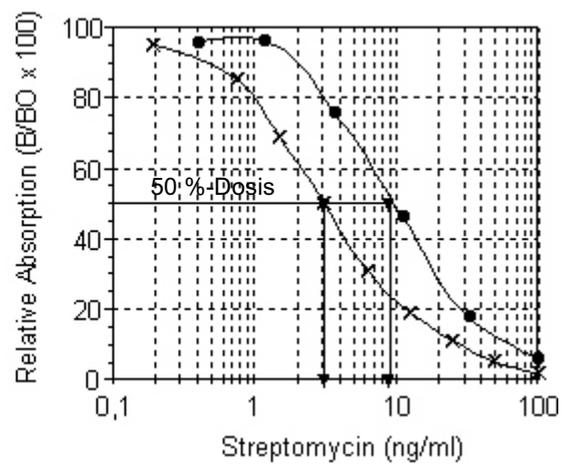


Abbildung 11: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Streptomycin in PBS (x) bzw. Milch (•) bei Verwendung verschiedener Festphasenantigene:

A: Streptomycin-ABH-GlcOx

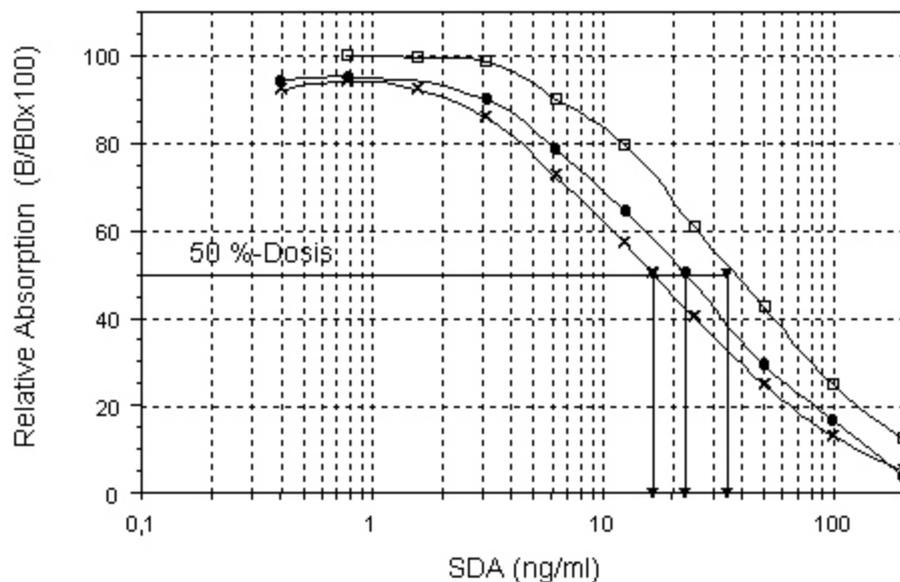
B: Streptomycin-Oxim-GlcOx

C: Streptomycin-Oxim-OVA

D: Streptomycin-Oxim- β -Casein

Der Einsatz unterschiedlicher Festphasenantigene zum Nachweis von **Sulfadiazin** resultierte in folgenden Ergebnissen: bei der Erstellung von Standardkurven unter Verwendung des mit Bernsteinsäure-Anhydrid derivatisierten Sulfadiazins als Festphasenantigen wurde ein relativ hoher Background beim Einsatz von Milch verzeichnet. Das unter Verwendung von Carbonyldiimidazol hergestellte Kopplungsprodukt aus Sulfadiazin und Ovalbumin mußte in relativ hohen Konzentrationen (3-4 µg/ml) eingesetzt werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Bei der Überprüfung der beiden Perjodat-gekoppelten Sulfadiazin-GlcOx-Konjugate (Ansatz 1 und 2, molare Verhältnisse 1:2000 bzw. 1:8000) erwies sich Ansatz 2 um den Faktor 2 empfindlicher als Ansatz 1, ferner konnte das Coating-Antigen in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden. Die Überprüfung der Sensitivität für Sulfadiazin - unter Verwendung des SDA-GlcOx, Ansatz 2 als Festphasenantigen - ergab 50 %-Werte von 17 ng/ml (PBS) bzw. 23 ng/ml (Milch) (Abb. 12). Damit ist eine zuverlässige Nachweisbarkeit von Sulfadiazin innerhalb des gesetzlich festgelegten Rahmens (MRL: 100 ng/ml) gewährleistet. Die Überprüfung der Spezifität mit diesem Testsystem zeigte, dass der Antikörper gegen Sulfadiazin geringe Kreuzreaktionen (3,2 -12,5 %) mit Sulfathiazol, Sulfapyridin und Sulfamerazin aufweist, wobei nur bei Sulfathiazol größere Unterschiede bei den in PBS und Milch durchgeführten Untersuchungen auftraten. Ausgeprägte Kreuzreaktionen wurden auch mit Sulfasalazin (in PBS), das jedoch definitionsgemäß nicht den Sulfonamiden zuzuordnen ist, beobachtet (Tab. 15).

A



B

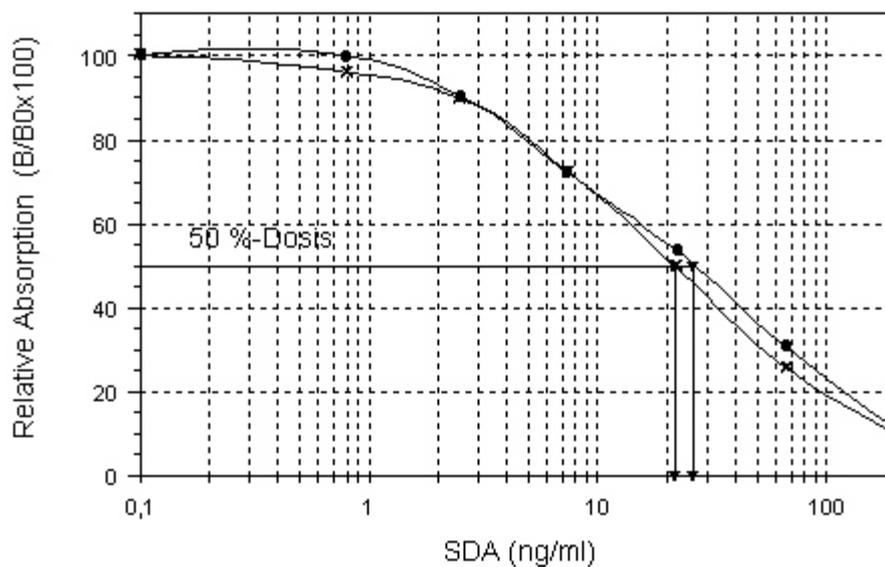


Abbildung 12: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Sulfadiazin in PBS (x) bzw. Milch (•) bei Verwendung verschiedener Festphasenantigene:

A) Sulfadiazin-GlcOx, Ansatz 2

Sulfadiazin-GlcOx, Ansatz 1 (□), nur in PBS

B) Sulfadiazin-HS-GlcOx

Tabelle 15: Relative Kreuzreaktionen (KR) des Sulfadiazin-Antikörpers mit anderen Sulfonamiden in PBS bzw. Milch unter Verwendung von SDA-GlcOx (Ansatz 2) als Festphasenantigen

Substanz (Sulfa-)	MG	Standardkurve in	50 % (ng/ml)	KR (%)
-diazin	250,3	PBS	24,8	100
		Milch	27,9	100
-methazin	278,3	PBS	>10000	< 1
		Milch		
-thiazol	255,3	PBS	212,6	12,5
		Milch	367,4	6,90
-pyridin	249,3	PBS	735,5	3,4
		Milch	768,0	3,2
-merazin	264,3	PBS	204,7	12,5
		Milch	252,5	10,4
-salazin	398,4	PBS	87,6	50,0
		Milch	287	13,9

Alle anderen Sulfonamide zeigten bei Konzentrationen von 10 µg/ml keine oder nur geringe Kreuzreaktionen (< 0,01 %) und sind somit mit diesem Testsystem nicht nachweisbar.

Bei der Überprüfung der Sensitivität der Testsysteme für **Sulfamethazin** unter Verwendung der verschiedenen Festphasenantigene erwies sich im Gegensatz zum SDA-Nachweis das nach Derivatisierung mit Bernsteinsäureanhydrid mittels Carbodiimid-Methode hergestellte Coating-Antigen (SMA-HS-GlcOx) im Hinblick auf die erreichbare Sensitivität als überlegen (50 %-Dosis in PBS 14,6 ng/ml bzw. 18,6 ng/ml in Milch; Abb. 13). Die ermittelten 50 %-Werte für die beiden Perjodat-gekoppelten Beschichtungsantigene lagen bei über 20 ng/ml. Bei der Bestimmung der relativen Kreuzreaktionen mit strukturverwandten Substanzen zeigte sich, dass der monoklonale Antikörper nur eine geringe Kreuzreaktivität mit Sulfamerazin (3,8 bzw. 3,4 % in PBS bzw. Milch) aufweist, so dass dieses Testsystem als hochspezifisch für den Nachweis von Sulfa-methazin angesehen werden kann (Tab. 16).

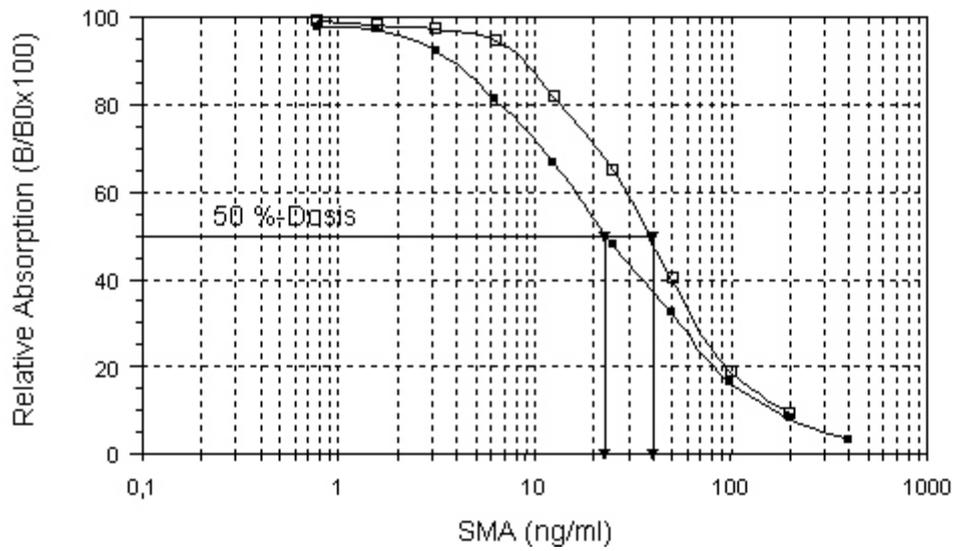


Abbildung 13a: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Sulfamethazin in PBS, Festphasenantigen SMA-GlcOx, Ansatz 1 (□) und Ansatz 2 (■).

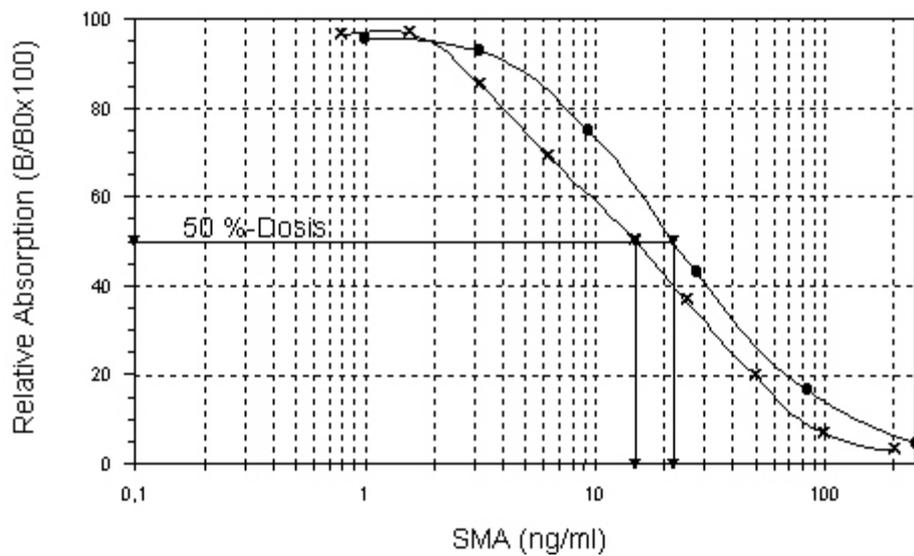


Abbildung 13b: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Sulfamethazin in PBS (x) bzw. Milch (●) bei Beschichtung mit SMA-HS-GlcOx.

Tabelle 16: Relative Kreuzreaktion (KR) des Sulfamethazin-Antikörpers mit Sulfamerazin in PBS bzw. Milch unter Verwendung von SMA-HS-GlcOx als Festphasenantigen

Substanz (Sulfa-)	MG	Standardkurve in	50 % (ng/ml)	KR (%)
-methazin	278,3	PBS	20,00	100
		Milch	19,00	100
-merazin	264,3	PBS	508,9	3,80
		Milch	545,1	3,40

Alle anderen Sulfonamide zeigten bei Konzentrationen von 10 µg/ml keine oder nur geringe Kreuzreaktionen (< 0,01 %) und sind somit mit diesem Testsystem nicht nachweisbar.

Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität für den Antikörper gegen **Cloxacillin** bestätigte die von DIETRICH et al. (1998) ermittelten Daten. Die Nachweisgrenzen lagen wiederum weit unterhalb der gesetzlichen Höchstmengen (50 %-Wert in PBS 3 ng/ml bzw. 2 ng/ml in Milch; Abb. 14). Die Bestimmung der Kreuzreaktionen für andere β-Laktam-Antibiotika zeigte, dass das Testsystem nur spezifisch mit Isoxazolyl-Penicillinen reagierte. Hohe Empfindlichkeit konnte für den Nachweis von Dicloxacillin erreicht werden, aber auch Oxacillin kann noch unterhalb des MRL-Wertes (30 ng/ml) nachgewiesen werden, während die Sensitivität gegenüber Nafcillin gering ist (Tab. 17).

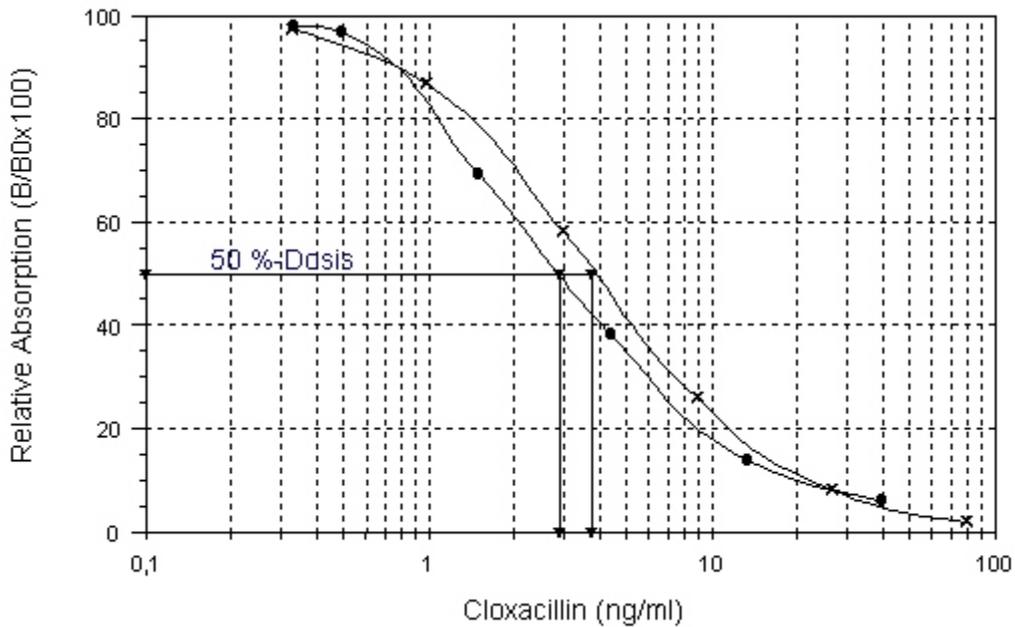


Abbildung 14: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Cloxacillin in PBS (x) bzw. Milch (•) bei Beschichtung mit Cloxacillin-GlcOx.

Tabelle 17: Relative Kreuzreaktionen (KR) des Cloxacillin-Antikörpers mit anderen Penicillinen in PBS bzw. Milch unter Verwendung von Cloxacillin-GlcOx als Festphasenantigen

Substanz	MG	Standardkurve in	50 % (ng/ml)	KR (%)
Cloxacillin	435,9	PBS	2,45	100
		Milch	2,40	100
Dicloxacillin	470,3	PBS	0,80	329
		Milch	0,53	600
Oxacillin	401,4	PBS	19,8	11,4
		Milch	21,0	12,0
Nafcillin	454,5	PBS	> 10 000	< 0,1

Alle anderen getesteten β -Laktam-Antibiotika zeigten keine Kreuzreaktion bei Konzentrationen von 10 μ g/ml.

Für den Nachweis von **Ampicillin** im indirekten ELISA-Format mittels monoklonalem Antikörper wurden wiederum mehrere Festphasenantigene synthetisiert. Neben Ampicillin-Protein-Konjugaten wurden auch heterologe Kombinationen (Epicillin- und Metampicillin-GlcOx) überprüft. Die Verwendung von Metampicillin-GlcOx ergab jedoch einen hohen Background, die Ampicillin-Konjugate lagen in ihrer Empfindlichkeit hinter dem Testsystem mit Epicillin-GlcOx (Ergebnisse nicht dargestellt). Die ermittelten Nachweisgrenzen sowohl in PBS als auch in Milch lagen bei ca. 7 ng/ml. Signifikante Kreuzreaktionen konnten mit Amoxicillin, Epicillin und Metampicillin gemessen werden, für weitere untersuchte Penicilline lagen sie ≤ 10 % (Tab. 18).

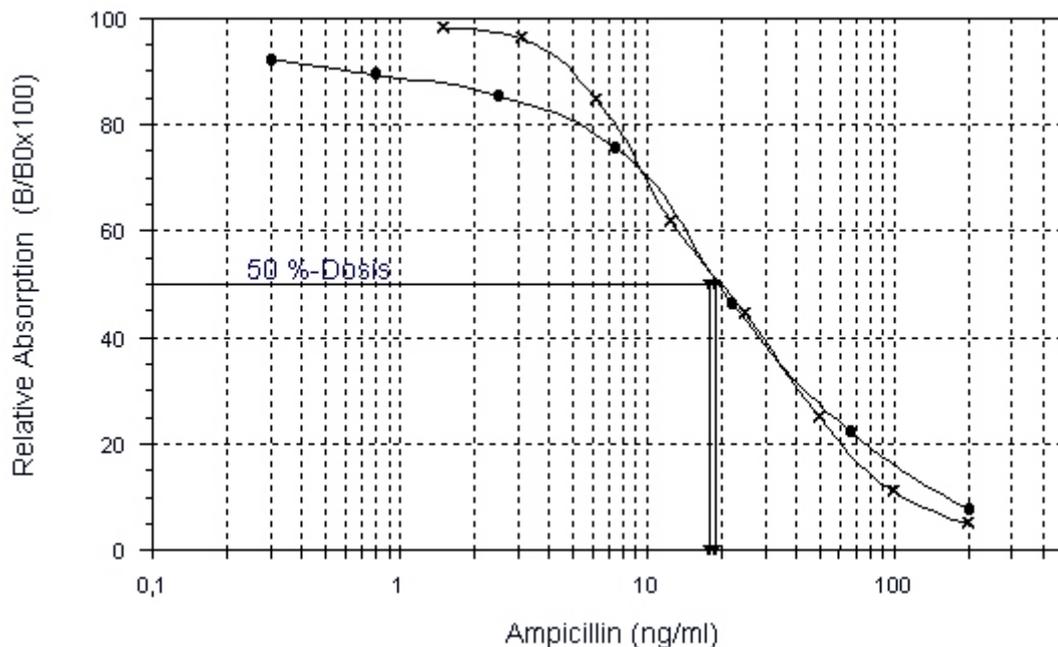


Abbildung 15: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Ampicillin in PBS (x) bzw. Milch (•) bei Beschichtung mit Epicillin-GlcOx.

Tabelle 18: Relative Kreuzreaktionen (KR) des monoklonalen Ampicillin-Antikörpers mit anderen Penicillinen in PBS bzw. Milch unter Verwendung von Epicillin-GlcOx als Festphasenantigen

Substanz	MG	Standardkurve in	50 % (ng/ml)	KR (%)
Ampicillin	348,4	PBS	26,0	100
		Milch	17,3	100
Penicillin G	333,4	PBS	290	8,6
		Milch	219	7,6
Amoxicillin	365,4	PBS	25,2	108,7
		Milch	16,6	100
Oxacillin	401,4	PBS	670	4,5
		Milch	339	6,3
Cloxacillin	435,9	PBS	680	4,8
		Milch	562	4,1
Dicloxacillin	470,3	PBS	2069	1,7
		Milch	2406	1,0
6-APA	216,3	PBS	4056	0,4
		Milch	-	-
Azlocillin	460,5	PBS	691	5,0
		Milch	318	7,2
Bacampicillin	465,5	PBS	2048	1,7
		Milch	7377	0,3
Epicillin	351,4	PBS	20,3	129,3
		Milch	11,0	167,0
Metampicillin	360,4	PBS	141	19,2
		Milch	73,5	25,0
Penicillin V	349,5	PBS	262	10,0
		Milch	109	16,7
Pheneticillin	363,5	PBS	1138	2,4
		Milch	618	2,9
Piperacillin	516,5	PBS	351	11,0
		Milch	255	10,2

Zur Etablierung eines indirekten Testformates für den Nachweis von **Penicillinen** mit dem gruppenspezifischen polyklonalen Antiserum wurde eine Vielzahl an Festphasenantigenen synthetisiert. Dazu wurde Ampicillin über Carbodiimid sowohl an Glukoseoxidase als auch an Ovalbumin in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:10, 1:50, 1:100) gekoppelt, sowie an β -Casein im Verhältnis 1:50. Des Weiteren wurde die Perjodat-Methode zur Kopplung von Ampicillin an Glukoseoxidase herangezogen. Mit keinem dieser Konjugate konnte jedoch die Empfindlichkeit des direkten Testformates für Penicillin G erreicht werden (3.2.1.1.1). Auch die Verwendung anderer Penicilline, zu denen das Antiserum eine geringere Affinität aufweist, zur Herstellung heterologer Festphasenantigene (Epicillin- bzw. Metampicillin-GlcOx, über Carbodiimid gekoppelt), erbrachte keine Steigerung der Sensitivität. Jedoch konnten durch den Einsatz lumineszierender Substrate die Konzentrationen der beiden Festphasenantigene Ampicillin-GlcOx und -OVA sowie die Verdünnung des Antiserums im Vergleich zur herkömmlichen Testdurchführung erheblich reduziert werden. Die Konzentration der Coating-Antigene lag im Bereich von 20-250 ng/ml, das Antiserum konnte bis zu 1:16.000 verdünnt werden. Dies hatte einen erheblichen Anstieg der Sensitivität im Vergleich zur Verwendung des chromogenen Substrates mit 50 %-Werten von ca. 2 ng/ml (OVA-Beschichtung) bzw. 3,5 ng/ml (GlcOx-Beschichtung) zur Folge (Abb. 17). Die Bestimmung der relativen Kreuzreaktion mit relevanten Penicillinen zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen direktem und indirektem Assay. In Tab. 19 sind nur die Kreuzreaktionen mit den gesetzlich relevanten Penicillinen aufgeführt.

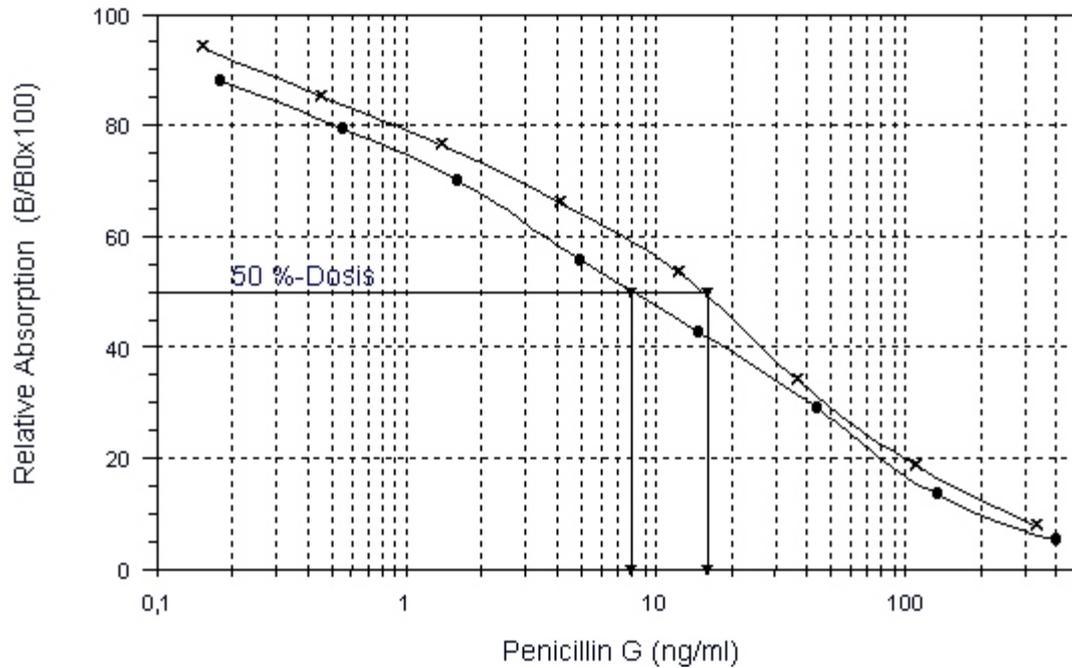


Abbildung 16: Charakteristische Standardkurven für den Nachweis von Penicillin G in PBS (x) bzw. Milch (•) im indirekten ELISA bei Beschichtung mit Ampicillin-GlcOx (Kopplungsverh. 50:1) und Verwendung des polyklonalen Antiserums.

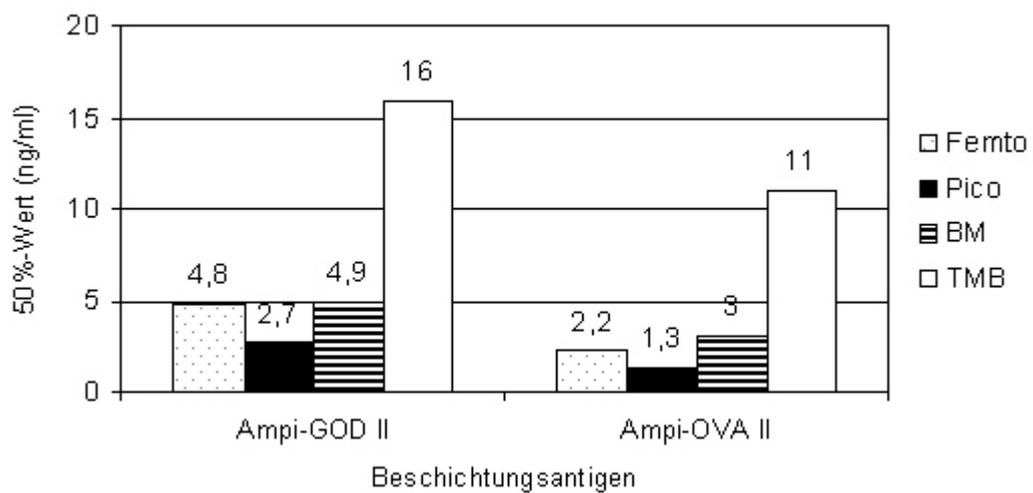


Abbildung 17: Nachweis von Penicillin G in PBS unter Verwendung zweier verschiedener Coating-Antigene (Ampicillin-GlcOx und Ampicillin-OVA; Kopplungsverhältnis 50:1): Einfluß verschiedener Substrate (lumineszierend: Femto, Pico, BM; chromogen: TMB) auf die Testempfindlichkeit.

Tabelle 19: Relative Kreuzreaktionen (KR) des polyklonalen Antiserums mit anderen Penicillinen im indirekten ELISA in PBS bzw. Milch unter Verwendung von Ampicillin-GlcOx (50:1) als Festphasenantigen

Substanz	MG	Standardkurve in	50 % (ng/ml)	KR (%)
Penicillin G	333,4	PBS	24,7	100
		Milch	32,2	100
Ampicillin	348,4	PBS	22,0	119
		Milch	36,5	92,4
Amoxicillin	365,4	PBS	48,3	56,1
		Milch	87,1	40,8
Oxacillin	441,4	PBS	18,6	161
		Milch	45,1	86,6
Cloxacillin	475,9	PBS	50,8	63,5
		Milch	80,6	52,4
Dicloxacillin	510,3	PBS	83,6	41,6
		Milch	126	36,2

Tabelle 20: MRL-Werte und Nachweisgrenzen der optimierten indirekten Testsysteme im Vergleich mit den direkten ELISAs (MÄRTLBAUER et al., 1994; DIETRICH et al., 1998)

Nachweis von	MRL-Wert (ng/ml)	Nachweisgrenze (ng/ml)	
		direkter Assay	indirekter Assay
Streptomycin	200	1,1	2
Sulfadiazin	100	9	9
Sulfamethazin	100	15	7
Cloxacillin	30	-	0,8
Ampicillin	4	12	7
Penicillin G	4	1	6

3.2.2.3 Entwicklung eines semiquantitativen Multianalyt-Schnelltests

Neben der in 3.2.2.2 beschriebenen Testentwicklung zum Einzelnachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Penicillinen wurde in einer weiteren Versuchsreihe ein alternatives Testsystem zum **simultanen Schnell-Nachweis** mehrerer antimikrobieller Rückstände in Milch entwickelt, wobei insbesondere der Einfluß der Parameter (kürzere) Inkubationszeiten, (höhere) Immunreagenzien-Konzentrationen und simultaner Nachweisschritt auf die Testsensitivität und -performance überprüft wurden. Dieser konzeptionelle Ansatz sollte zudem dazu dienen, erste Erfahrungen im Hinblick auf eine Implementierung der Immunreagenzien auf einem Biochip zu sammeln.

Zur Durchführung wurden die gleichen Immunreagenzien wie für die optimierten Einzelnachweissysteme verwendet (Tab.13). Von einem Einsatz des polyklonalen Antiserums zum Nachweis von Penicillinen wurde aufgrund des zunächst für monoklonale Antikörper konzipierten Testdesigns sowie der unzureichenden Testsensitivität (bei Verwendung eines chromogenen Substrates) abgesehen.

Da im Rahmen dieser Testentwicklung die Inkubationszeiten im Vergleich zum konventionellen Verfahren massiv reduziert werden sollte (von 140 auf 15 min), mußten zunächst, wie in 3.2.2.2.2 beschrieben, wiederum die optimalen Konzentrationen aus Festphasenantigenen und Antikörpern für die jeweiligen Systeme ermittelt werden.

Für den parallelen Nachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Cloxacillin und Ampicillin in einer Mikrotiterplatte wurden definierte Kavitäten eines Mikrotitertabletts mit den jeweiligen Coating-Antigenen beschichtet (Abb. 18). Nach Absättigen mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung (30 min) wurden antigen-freie Milch (LW) sowie dotierte Milchproben (1/2x, 1x, 2x MRL-Wert der zu testenden Substanzen) im Vierfachansatz mit einem Cocktail der entsprechenden Antikörper 5 min inkubiert. Analog zur konventionellen Testanordnung erfolgte danach die Zugabe peroxidasemarkierter Sekundäntikörper und der Substrat-/Chromogen-Lösung, wobei die Inkubationszeiten jeweils 5 Minuten betragen. Die Auswertung erfolgte

durch Berechnung der relativen Hemmung (in %) durch die kontaminierten Milchproben in Relation zum antigen-freien Kontrollansatz (Tab. 22).

Neben dem semiquantitativen Ansatz wurden zur Validierung des Tests - insbesondere zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität - analog zur Etablierung der Einzelnachweise (3.2.2.2.2 bzw. 3.2.2.2.3) Standardkurven erstellt, anhand derer die Sensitivität und die Kreuzreaktionen für relevante Antibiotika und Sulfonamide unter diesen modifizierten Bedingungen ermittelt wurden. Die Meßbereiche dieser Standardkurven lagen zwischen 2,1 und 5000 ng/ml für Penicilline, Sulfadiazin und Sulfamethazin, zwischen 0,25 und 60 ng/ml für Isoxazolyl-Penicilline sowie zwischen 1,6 und 400 ng/ml für Streptomycin und Dihydrostreptomycin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		LW										
B		LW										
C		2x MRL										
D		2x MRL										
E		1x MRL										
F		1x MRL										
G		½x MRL										
H		½x MRL										

Cloxacillin
Streptomycin
Sulfadiazin
Sulfamethazin
Ampicillin

Abbildung 18: Plattenbelegung bei der Überprüfung der Testcharakteristika des Mikrotiterplatten-Schnelltests zum simultanen Nachweis von Cloxacillin, Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Ampicillin in Milch.

Tabelle 21: Verwendete Immunreagenzien zum Schnelldachweis von Antibiotika und Sulfonamiden im Multianalytttest (vergleiche Tab. 13)

Nachweis von	Immunreagenzien-Konzentrationen			
	Antikörper		Beschichtungs-Antigen	
	Bezeichnung	ng/ml	Bezeichnung	ng/ml
Streptomycin	4E2	625	Streptomycin-ABH-GlcOx	5000
Sulfadiazin	2G6	625	SDA-GlcOx (Ansatz 2)	2500
Sulfamethazin	4D9	1000	SMA-HS-GlcOx	5000
Cloxacillin	1F7	650	Cloxacillin-GlcOx	1250
Ampicillin	3B5	600	Epicillin-GlcOx	5000

Die für den Multianalyt-Schnelltest eingesetzten Immunreagenzien sind in Tab. 21 aufgeführt. Die Gesamtinkubationszeit betrug 15 min - eine erhebliche Reduzierung im Vergleich zum konventionellen ELISA-Verfahren. Wie erwartet zeigte sich, dass dadurch Antikörper und Beschichtungs-Konjugate in weitaus höheren Konzentrationen (Faktor 5-10) als bei den konventionell durchgeführten Einzel-Tests eingesetzt werden mußten (vgl. Tab. 13 und Tab. 21). Dies resultierte zwar in einem gewissen Verlust der Testsensitivität, mit Ausnahme von Ampicillin konnten jedoch alle untersuchten Substanzen sogar unterhalb des halben vorgeschriebenen MRL-Wertes mittels dieses Multitests nachgewiesen werden (Tab. 22). Für den semiquantitativen Nachweis bei Dotierungen auf MRL-Niveau konnte für Ampicillin erst bei einer Dotierung mit dem 4-fachen entsprechenden MRL-Wert eine signifikante Hemmung (> 20 %) gemessen werden. Der semiquantitative Ampicillin-Schnelldachweis wurde daher für die weitere Auswertung in Tab. 22 und 23 nicht berücksichtigt. Die quantitative Auswertung nach Erstellung von Standardkurven (Abb. 19) zeigte, dass die ermittelte Empfindlichkeit dieses Testsystems für Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Cloxacillin zwar unterhalb der der Einzeltests (Tab. 23) lag, dennoch konnten die genannten Substanzen weiterhin deutlich unterhalb des jeweiligen MRL-Wertes nachgewiesen werden. Die relativen Kreuzreaktionen für Sulfonamide und Penicilline mit strukturell ähnlichen Substanzen sind den Tab. 24 und 25 zu entnehmen. Der 50 %-Wert für Streptomycin lag im Schnelltest bei 44,2 ng/ml, für Dihydrostreptomycin bei 43,3, dies entspricht einer Kreuzreaktion von 114,3 %.

Tabelle 22: Semiquantitativer Nachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Cloxacillin im Multianalyt-Schnelltest. Milch wurde mit verschiedenen Konzentrationen (1/2x, 1x, 2x MRL-Wert) künstlich kontaminiert und mittels Multianalyt-Assay untersucht. Dargestellt sind die jeweilige durchschnittliche Hemmung (in %) in Relation zum antigen-freien Kontrollansatz sowie die entsprechenden Standardabweichungen

eingesetzte Konzentration	Parameter	Streptomycin (n = 8)	SDA (n = 10)	SMA (n = 9)	Cloxacillin (n = 9)
1/2 x MRL	% Hemmung	80	44	46	79
	s	2,2	8,0	4,4	3,8
1 x MRL	% Hemmung	88	61	65	90
	s	1,1	7,1	3,4	1,8
2 x MRL	% Hemmung	94	75	79	96
	s	1,1	7,1	4,2	1,3

% Hemmung = durchschnittliche relative Hemmung, ausgedrückt als Absorption der Proben (B) in Relation zur Absorption des antigen-freien Standards (B0), berechnet nach der Formel $100 - (B/B0 \times 100)$; s = Standardabweichung

Tabelle 23: MRL-Werte und Nachweisgrenzen in Milch für Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Cloxacillin in den Einzelnachweisen und im Multianalyt-Schnelltest

Nachweis von	MRL (ng/ml)	Nachweisgrenze	
		Einzelnachweis	Multitest
Streptomycin	200	2	14
Sulfadiazin	100	9	20
Sulfamethazin	100	7	13
Cloxacillin	30	0,8	1,7

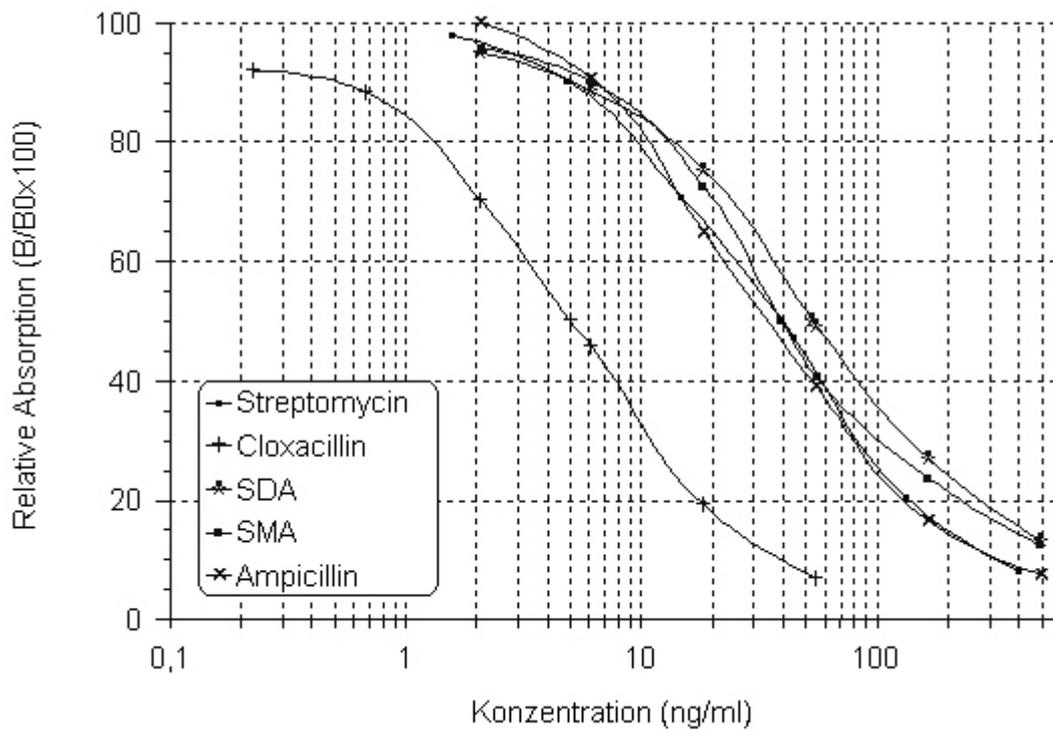


Abbildung 19: Standardkurven für die im Multianalyt-Schnelltest untersuchten Antibiotika und Sulfonamide.

Tabelle 24: Kreuzreaktionen der im Mikrotiterplatten-Schnelltest verwendeten Sulfonamide mit strukturverwandten Analoga

getestete Sulfonamide (Sulfa-)	MG	Sulfadiazin-Nachweis		Sulfamethazin-Nachweis	
		50 %-Wert (ng/ml)	KR (%)	50 %-Wert (ng/ml)	KR (%)
-diazin	250,3	62,20	100	-	-
-methazin	278,3	-	-	39,4	100
-thiazol	255,3	832,1	7,70	-	-
-pyridin	249,3	1481	4,20	-	-
-merazin	264,3	624,1	10,6	843	4,40
-salazin	398,4	658,2	15,2	-	-

Tabelle 25: Im Mikrotiterplatten-Schnelltest meßbare Kreuzreaktivitäten der verwendeten monoklonalen Antikörper mit strukturverwandten Analoga

getestete Antibiotika	MG	Cloxacillin-Nachweis		Ampicillin-Nachweis	
		50 %-Wert (ng/ml)	KR (%)	50%-Wert (ng/ml)	KR (%)
Ampicillin	348,4	-	-	39,00	100
Amoxicillin	365,4	-	-	25,60	157
Penicillin G	333,4	-	-	498,3	7,40
Oxacillin	401,4	24,0	16,7	858,0	5,24
Cloxacillin	435,9	5,00	100	699,5	6,88
Dicloxacillin	470,3	2,10	250	775,2	6,88
Azlocillin	460,5	-	-	748,5	6,75
Epicillin	351,4	-	-	17,40	220
Metampicillin	360,4	-	-	152,5	26,2
Penicillin V	349,5	-	-	459,8	8,30
Pheneticillin	363,5	-	-	1362	2,90
Piperacillin	516,5	-	-	487,5	11,7

3.2.3 Anwendung der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden

3.2.3.1 Untersuchung hemmstoffpositiver Praxisproben

Zur Validierung der enzymimmunologischen Tests zum gruppenspezifischen Nachweis der Penicilline (im direkten kompetitiven ELISA) und zum Einzelnachweis von Cloxacillin und Streptomycin (indirekte kompetitive ELISAs) wurden 321 Hemmstoff-positive und 13 -negative Praxisproben aus der Untersuchungstätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. (MPR) untersucht. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 1,5 Jahren (Juni 2000 - November 2001) in einem der drei Zentrallabors des MPR gesammelt und bei -18°C bis zum Untersuchungszeitpunkt gelagert. Vor Durchführung der ELISA-Untersuchungen wurde mittels des BRT-Hemmstofftests als „Referenzverfahren“ überprüft, ob infolge von Lagerung, Transport und/oder Auftauvorgang ein Abbau der Antibiotika und damit ein Verlust der „Hemmstoff-positiven“ Eigenschaften eingetreten war. Die Auswertung des Hemmstofftests erfolgte nach Methode L 01.01-5 der Amtlichen Sammlung, § 35 LMBG. Zusätzlich wurden alle Hemmstoff-positiven Proben auf ihre β -Laktamase-Festigkeit überprüft, d.h. es wurde getestet, ob die Hemmstoff-positive Wirkung auf Penase-empfindliche Penicilline oder eine andere Ursache zurückzuführen war. Hierzu wurde der Milch Penicillinase-Lösung in einer Konzentration von 100.000 IE/ml zugesetzt (10 μl einer 10 Mio. IE/ml Penicillinase-Lösung auf 100 μl Probe). In zweifelhaften Fällen wurde auch ein Rezeptor-Schnelltest (SNAP Beta-Laktam-Test) hinzugezogen, der spezifisch mit β -Laktam-Antibiotika reagiert.

Milchproben für den enzymimmunologischen Nachweis der Penicilline wurden durch Zentrifugieren (2000 x g/ 4°C / 15 min) entfettet, für den Nachweis im Cloxacillin- und Streptomycin-ELISA bedurfte es keiner Probenvorbereitung. Die Proben wurden zunächst unverdünnt im Vierfachansatz in die Enzymimmunoassays eingesetzt. Positive Proben, deren relative Extinktionswerte (B/B₀) unter 20 % lagen, wurden in einem weiteren Ansatz in mit A. dest. rekonstituiertem Magermilchpulver (für Penicillin-Nachweis in 10 %-iger, für Cloxacillin- und Streptomycin-Nachweis in 12 %-iger (g/v) Magermilch) verdünnt. Zur quantitativen

Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen wurden Mittelwerte aus den im linearen Bereich der Standardkurve (20-80 % B/B0) gelegenen Einzelergebnissen gebildet.

Für den BRT-Hemmstofftest wurden von jeder (nicht entfetteten) Milchprobe 0,1 ml im Doppelansatz in die Kavitäten des Testtablets pipettiert, sowie eine Negativ- und Positivkontrolle (4 ng/ml Penicillin G in hemmstofffreier Milch) angesetzt. Nach Inkubation von ca. 2,5 Stunden im Wasserbad bei 64 °C wurde die Farbentwicklung der Negativkontrolle beurteilt. Nach Anleitung des Herstellers ist der Test abgeschlossen, wenn diese eine deutlich gelbe Färbung aufweist. Anschließend wurde die Milch aus den Kavitäten abgeschüttet, vorsichtig mit A. dest. nachgespült und die Farbentwicklung der Proben mit denjenigen der Kontrollansätze verglichen.

Nach der Milch-Güte-Verordnung ist eine Verifizierung oder Identifizierung Hemmstoffpositiver Milchproben nicht vorgesehen, wobei allerdings üblicherweise positive Proben in der Praxis durch serielle Verdünnungsreihen und Penicillinase-Zusatz nachuntersucht werden. Nach Vorinformationen durch den MPR Bayern e.V. waren viele der zur Verfügung gestellten Proben schwach positiv (negatives Ergebnis nach 1:2-Verdünnung, dies läßt auf ursprüngliche Konzentrationen von ≤ 4 ng/ml schließen), die meisten wurden nach Penicillinase-Zusatz negativ (Hinweis auf Penicilline). Von den 321 gesammelten Hemmstoff-positiven Praxisproben erwiesen sich in unserem Labor im BRT-Hemmstofftest noch 230 Proben als positiv ($> 1-2$ ng/ml). Von diesen ergaben 214 im gruppenspezifischen Penicillin-ELISA positive Ergebnisse in verschiedenen Konzentrationsbereichen, wobei die höchste gemessene Konzentration bei 4000 ng/ml Penicillin-Äquivalenten lag. Der Cloxacillin-ELISA reagierte bei 28 von 214 Proben positiv (maximal ermittelte Konzentration 630 ng/ml), wobei diese Proben zuvor auch im gruppenspezifischen Penicillin-ELISA positive Ergebnisse erbrachten. Tab. 26 schlüsselt die gemessenen Proben in Konzentrationsbereiche auf. Auf Streptomycin wurden insgesamt 133 Proben untersucht, davon erwiesen sich 6 Proben als positiv. Die nachgewiesenen Konzentrationen lagen jedoch in Bereichen, die keine Höchstwertüberschreitungen bedeuten (4-91 ng/ml). Alle in den Labors des MPR Bayern e.V. negativ getesteten Proben (n=13) erwiesen sich wiederum in allen Testsystemen (BRT-Test und ELISAs) als negativ.

Mit keinem der eingesetzten enzymimmunologischen Testsysteme konnte bei 16 der im BRT-Test positiven Proben ein antimikrobieller Rückstand festgestellt werden. Der Einsatz von Penicillinase ergab für diese Proben im BRT-Test nach wie vor ein positives Ergebnis. Vier Proben wurden nicht weiter untersucht, weiterführende Untersuchungen für zwölf dieser Proben mit einem qualitativen Rezeptor-Schnelltest (SNAP Beta-Laktam-Test) ergaben in neun Fällen ein positives Ergebnis, drei davon waren negativ. Aufgrund des die gesamte Gruppe der β -Laktame, also Penicilline und Cephalosporine, erfassenden Nachweisspektrums dieses Rezeptor-Schnelltests, sowie die positiven Ergebnisse im mikrobiologischen Testsystem und die Penase-Festigkeit dieser Proben, kann bei diesen neun Proben von einer Kontamination mit Cephalosporinen ausgegangen werden. Eine weitere Differenzierung wurde jedoch nicht vorgenommen. Die drei anderen Proben enthielten demnach keine β -Laktam-Antibiotika, sondern einen Hemmstoff, der einer anderen Antibiotika-Klasse zugeordnet werden muß.

Tabelle 26: Untersuchung Hemmstoff-positiver (230) und -negativer (13) Praxisproben: Vergleich des mikrobiologischen Hemmstofftests (BRT) und der enzymimmunologischen Verfahren

BRT-Test	n	Korrespondierende ELISA-Ergebnisse, Konzentrationsbereich	Penicillin-ELISA	Cloxacillin-ELISA
		(ng/ml)	n	n
positive	230	<1	16	186
(>1-2 ng/ml		> 1-3	77	-
Penicillin G-		>3-10	50	1
Äquivalente)		>10-100	69	16
		>100	18	11
negative	13	<1	13	13

3.2.3.2 Nachweis von Antiinfektiva mittels Biosensor unter Verwendung eines Antigen-Microarrays

Im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsvorhabens mit dem Institut für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München wurde mit den in dieser Arbeit entwickelten Immunreagenzien ein Biosensorsystem zum simultanen Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch entwickelt. Die Basis bildet ein planarer Biochip, auf dem die unterschiedlichen Tests gleichzeitig ablaufen. Die “Erkennung” der gesuchten Substanzen wird durch die biologische Komponente (markierte Antikörper und die entsprechenden immobilisierten Antigene) ermöglicht. Nach der spezifischen Bindungsreaktion wird ein Lumineszenzsignal erzeugt, das die eigentliche Meßgröße darstellt und mit einer CCD-Kamera automatisch registriert wird. In Abb. 20 findet sich eine Darstellung des ersten Prototypen.

Zur Messung von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Cloxacillin mittels Biosensor wurden die in Tab. 21 aufgeführten Immunreagenzien verwendet. Die Schritte des indirekten ELISA-Formates wurden in eine Durchflußzelle übertragen, die Zuführung der Reagenzien erfolgte automatisch über Pumpen. Die Messzeit betrug insgesamt ca. 5 Minuten. Die Immobilisierung der Coating-Antigene erfolgte adsorptiv auf der hydrophobierten Oberfläche von Glas-Biochips, die Messungen wurden mit einem sog. Parallelen Affinitätssensor-Array (PASA) durchgeführt. Der zentrale Teil des PASA-Sensors ist die Flußzelle mit dem Biochip, der eine Wand der Flußzelle darstellt (Abb. 21). Alle Reagenzien und Proben werden durch diese Flußzelle gepumpt. Die Detektion beruht auf der Chemilumineszenz durch gebundene Peroxidase. Die Endauswertung und Steuerung der anderen Komponenten wird von dem angeschlossenen Steuerrechner vorgenommen. Zur Erstellung von Kalibrierkurven wurden jeweils 8-10 identische Chips hergestellt. Mit diesen wurde anschließend eine Konzentrationsreihe des entsprechenden Analyten mit aufsteigenden Konzentrationen in Milch gemessen. Aus den Spotintensitäten für die verschiedenen Analytkonzentrationen konnte schließlich eine Kalibrierkurve erstellt werden. Für den Multianalytchip wurden für jeden zu messenden Analyten jeweils sieben Spotreplikate in einer Reihe sowie mehrere Referenzspotreihen aufgebracht.



Abbildung 20: *Bisensor-Prototyp: An der Frontseite befinden sich acht Spritzpumpen für die Zuführung der Reagenzien in die Durchflusszelle. Im Fenster links sind die Vorratsbehälter für die Waschlösung bzw. Sammelbehälter für verbrauchte Lösungen untergebracht. An der Oberseite befindet sich die Durchflußzelle. Nach dem Einlegen des Chips wird dieser beim Schließen des Deckels automatisch angepreßt und das Gerät ist sofort für eine neue Messung bereit. Unterhalb der Zelle ist eine hochempfindliche CCD-Kamera angebracht. Das Gerät wird über ein handelsübliches Notebook mit Betriebssystem Windows 98 gesteuert.*

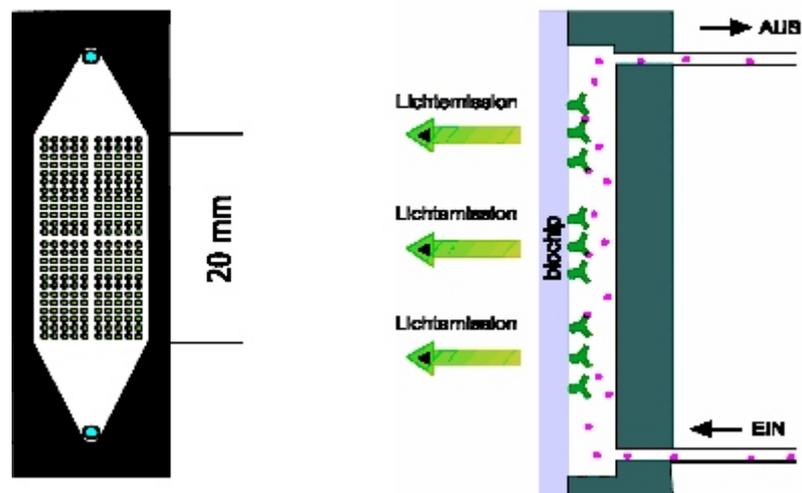


Abbildung 21: Schematische Ansicht der Durchflusszelle mit dem Biochip.

Bei der Entwicklung des PASA-Verfahrens wurde im wesentlichen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Erfahrungen bestätigt. Auch nach Transfer des Multianalyt-Schnelltestverfahrens (siehe 3.2.2.3) auf Biochips und einer weiteren Reduzierung der Testdauer auf ca. 5 min lagen die erzielten Nachweisgrenzen deutlich unter den gesetzlichen Höchstmengen, so dass mit diesem System mit einer einzigen Messung innerhalb kürzester Zeit eine Milchprobe auf mehrere Antiinfektiva gleichzeitig untersucht werden kann. In Abb. 22 ist eine Messung ohne und mit Zusatz verschiedener Konzentrationen an Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Cloxacillin in Milch aufgeführt, entsprechende Standardkurven für Sulfamethazin und Cloxacillin in Milch sind in Abb. 23 dargestellt.

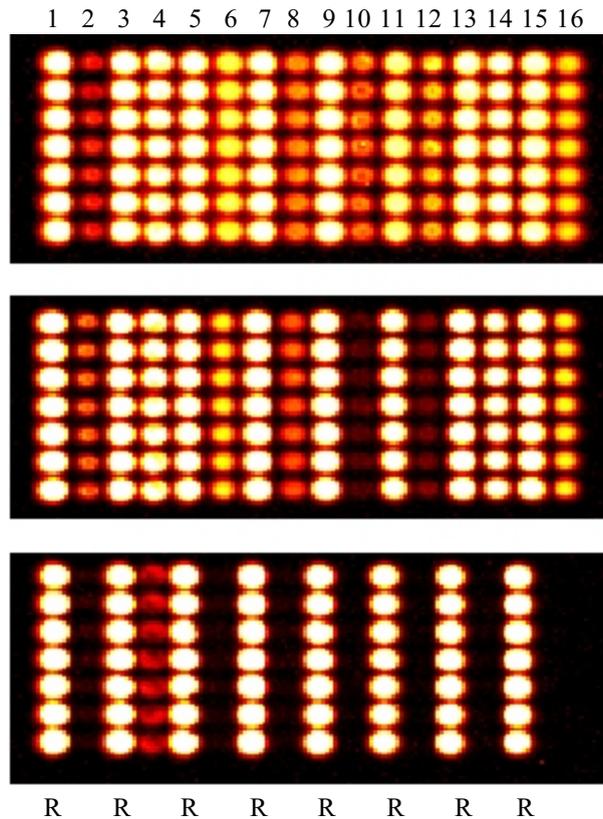


Abbildung 22: *CCD-Aufnahmen des aktiven Ausschnitts eines "Multichip" (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn B. Knecht, Institut für Wasserchemie, TU München): Ein Biochip wurde in vertikalen Reihen (sieben Spotreplikate pro Reihe) alternierend mit Trinitrobenzolsäure-Ovalbumin (Kontrollansatz; R) bzw. antibiotikamarkierter Glukoseoxidase beschichtet. Hier wurde für jeden Nachweis das Festphasenantigen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (Spalte 2/4 Sulfadiazin; Spalte 6/8 Sulfamethazin; Spalte 10/12 Cloxacillin; Spalte 14/16 Streptomycin) Die Analyt-Konzentrationen in der Probe betragen in der oberen Aufnahme 0, in der mittleren 10 und in der unteren 10000 ng/ml. Mit Zunahme der vier Analyten in der Probe werden die Spotintensitäten der Messspalten geringer, während die Intensität in den Referenzspalten konstant bleibt.*

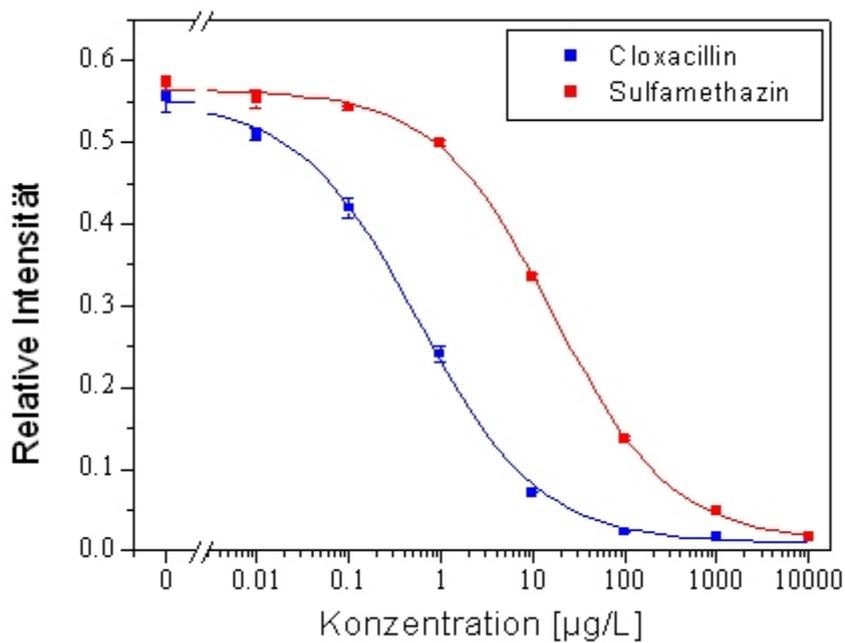


Abbildung 23: *Standardkurven für Sulfamethazin und Cloxacillin im Biosensor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn B. Knecht, Institut für Wasserchemie, TU München): Die Testmittelpunkte lagen für Sulfamethazin bei $16,8 \pm 1,5$ ng/ml und für Cloxacillin bei $0,58 \pm 0,06$ ng/ml. Die von den Meßspots erhaltenen Intensitäten wurden auf die der Referenzspots bezogen und sind als "relative Intensität" dargestellt.*

Rückstände von Tierarzneimitteln in Milch, insbesondere Antibiotika und Sulfonamide, stellen sowohl aus technologischer als auch aus gesundheitlicher Sicht ein hohes Risiko dar (PETERS et al., 1990; TOLLEFSON und MILLER, 2000). Nach EU-Verordnung 2377/90 wurden deshalb in den letzten Jahren Höchstmengen (Maximum Residue Limits, MRLs) für Antibiotika und Sulfonamide in Milch festgesetzt. Die Molkereien trifft eine eigene Verpflichtung gemäß Richtlinie 92/46 EWG, umgesetzt in § 16 Milchverordnung, dafür zu sorgen, dass die von ihnen in Verkehr gebrachten Produkte keine Arzneimittelrückstände enthalten. Die Einhaltung dieser gesetzlichen Vorgaben und die Gewährleistung einer guten Molkereipraxis erfordern die Etablierung zuverlässiger und empfindlicher Testsysteme.

Die in der Praxis eingesetzten Tests zum Nachweis von Hemmstoffen - vorwiegend mikrobiologische Systeme auf der Basis des BRT-Tests und Rezeptor-Schnelltests - erfordern teils einen hohen zeitlichen Aufwand bzw. erlauben keine Aussage über Identität und Quantität des nachgewiesenen Hemmstoffes. Darüber hinaus werden mit diesen Verfahren nicht alle Antibiotika und Sulfonamide in ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen. Wünschenswert wäre daher ein Nachweissystem, das in kurzer Zeit - möglichst schon auf Erzeugerebene - eine große Anzahl verschiedener Antiinfektiva detektieren kann. Zur Realisierung dieser Vorstellung sollte ein Biosensorsystem beitragen, das aufgrund seiner Konzeption als sog. Paralleler Affinitätssensor-Array den simultanen Nachweis verschiedener Antibiotika und Sulfonamide im Milch mittels einer einzigen automatisierten Messung ermöglicht. Die Entwicklung der dafür essentiellen biologischen Komponente, die durch sensitive und spezifische Antikörper sowie robuste Festphasenantigene repräsentiert wird, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.1 Direkter Enzymimmuntest zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen

Ziel des Versuchsvorhabens war die Entwicklung eines gruppenspezifischen Enzymimmuntests, der möglichst viele Penicilline für die Untersuchung von Milch erfasst. Zur Synthese des

Immunogens wurde in Anlehnung an USLEBER et al. (1998) Ampicillin aufgrund seiner höheren Stabilität gegenüber hydrolytischer Ringöffnung als Hapten verwendet, wobei die freie Aminogruppe durch das homobifunktionelle Kopplungsreagenz Glutaraldehyd an bovines Serumalbumin gekoppelt wurde. Von sechs immunisierten Kaninchen produzierte jedoch nur ein Tier ausreichend sensitive und spezifische Antikörper gegen Penicillin G.

Basierend auf theoretischen Überlegungen zur maximalen Empfindlichkeit (MÄRTLBAUER, 1993) wurde für den direkten kompetitiven ELISA eine heterologe Testanordnung angestrebt. Deswegen wurde Ampicillin mit Hilfe von wasserlöslichem Carbodiimid an Meerrettichperoxidase gekoppelt, ein Verfahren, bei dem die Carboxylgruppe des β -Laktam-Ringes als Kopplungsstelle dient (Seitenheterologie). Das entwickelte enzymimmunologische Nachweissystem für Penicilline zeichnete sich durch eine hohe Empfindlichkeit und breite Gruppenspezifität aus. Die 50 %-Dosis für Penicillin G betrug 2-4 ng/ml, die Nachweisgrenze lag bei 0,5-1 ng/ml. Somit erfaßt dieser Test Penicillin G sogar unterhalb des vorgeschriebenen Höchstwertes von 4 μ g/kg und ist um Faktor 3-4 empfindlicher als das von LITZ (1995) zum Nachweis von Penicillinen entwickelte Verfahren. Das Testsystem wies Kreuzreaktionen mit einer Reihe weiterer Penicilline auf, kaum meßbare Kreuzreaktionen konnten für Cephalosporine und hydrolysierte Penicilline bestimmt werden. Dies spricht dafür, dass bei der Immunisierung das verwendete Hapten-Protein-Konjugat den intakten β -Laktam-Ring als immunogene Determinante besaß und die Antikörper nicht, wie z.B. bei ROHNER et al. (1985) und BLACKMORE et al. (1988) beschrieben, gegen den geöffneten Ring gerichtet waren.

4.2 Etablierung indirekter enzymimmunologischer Testsysteme

Basierend auf monoklonalen Antikörpern gegen Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Cloxacillin und Ampicillin (MÄRTLBAUER et al., 1994; DIETRICH et al., 1998) und unter Einbeziehung des neu entwickelten polyklonalen Antiserums zum gruppenspezifischen Penicillin-Nachweis wurden indirekte kompetitive Enzymimmuntests etabliert. Insbesondere im Hinblick auf eine Integration aller Einzeltests auf ein Mikrotitertablett bzw. einen Biochip zum parallelen Nachweis verschiedener Antiinfektiva bieten indirekte ELISAs gegenüber direkten

Verfahren mehrere Vorteile. Zum einen kann durch die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Enzymmarkierten Sekundärantikörpers eine gleichbleibende Qualität und Standardisierbarkeit des Detektionsschrittes gewährleistet werden, zum anderen wird durch das zweistufige Prinzip ein Kontakt des Markerenzym mit der Milchprobe vermieden, wodurch das System weniger anfällig für Matrixeffekte wird (RECK und FREVERT, 1990). Weiterhin ermöglicht ein indirektes Testformat - insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung eines Biosensorsystems - die Herstellung stabiler und robuster Biochips, da entsprechend selektierte Hapten-Protein-Konjugate im Gegensatz zu Antikörpern kaum einer Denaturierung unterliegen (SCHÜTZ et al., 1999). Optional können des weiteren Modifikationen im Testablauf, z.B. Implementierung biotinylierter oder Fluoreszenz-markierter Antikörper zur Steigerung der Sensitivität (EKINS et al., 1989; WONG et al., 1991; WU et al., 2002) und Reduktion der Testzeit, jederzeit problemlos im indirekten System vorgenommen werden.

Die Umstellung der früher erstellten direkten Systeme (MÄRTLBAUER et al., 1994; DIETRICH et al., 1998) auf ein indirektes Testformat erforderte die Synthese von neuen Festphasen-antigenen, wobei im Hinblick auf die Vielzahl der zu erfüllenden Anforderungen an die Konjugate eine breite Palette unterschiedlicher Kopplungsprodukte hergestellt wurde. Aufgrund fehlender bzw. ungenügender UV-Absorption der Haptene konnten die Kopplungsraten für die in dieser Arbeit hergestellten Konjugate nicht ermittelt werden. Es erfolgte daher eine Überprüfung der Funktionalität - insbesondere Sensitivität, Spezifität, laborinterne Reproduzierbarkeit, Stabilität und Wirtschaftlichkeit - im jeweiligen Testsystem unter Verwendung der spezifischen Antikörper. Die Ermittlung der Sensitivität (Empfindlichkeit) und der Spezifität - die Fähigkeit einer Methode, zwischen dem gemessenen Analyten und anderen Stoffen zu unterscheiden - wurde für alle Matrices und Testanordnungen erneut durchgeführt, da diese Leistungsmerkmale zum einen vom Messverfahren abhängen, zum anderen je nach Substanzklasse oder Matrix schwanken können.

Für den simultanen Nachweis der verschiedenen Antiinfektiva war die Etablierung eines einheitlichen Nachweisprinzips notwendig. Daher wurde für alle Systeme ein indirektes Testformat erstellt. Insbesondere die dabei hergestellten Glukoseoxidase-Konjugate (GlcOx) zeichneten sich durch gute Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit aus. Obwohl GlcOx in

der ELISA-Technologie noch keine weite Verbreitung gefunden hat, vermag das Glykoprotein mit allen üblichen Kopplungsmethoden an Haptene gekoppelt werden und zeichnete sich durch hervorragende Coating-Eigenschaften sowohl in der Mikrotiterplatte als auch auf einem Biochip aus. Im Folgenden werden die Charakteristika der einzelnen Nachweissysteme vergleichend mit den direkten Tests sowie die Einsetzbarkeit der Immunreagenzien für einen Multianalytnachweis diskutiert.

4.2.1 Nachweis von Penicillinen

Zur Überprüfung homologer und heterologer Testanordnungen für den Nachweis von Penicillin G wurden verschiedene Festphasenantigene synthetisiert sowie unterschiedliche Testdurchführungen überprüft. Unter Verwendung des **polyklonalen Antiserums** konnte jedoch mit keinem der synthetisierten Coating-Antigene die Sensitivität des direkten Systems (vgl. 4.1) erreicht werden. Einige Hapten-Protein-Konjugate mußten in Konzentrationen von bis zu 5 µg/ml eingesetzt werden (z.B. über Carbonyldiimidazol gekoppeltes Ampicillin-GlcOx/OVA) und wurden aus praktischen Erwägungen nicht weiter charakterisiert.

Die Verwendung heterologer Coating-Antigene (Epi- und Metampicillin-GlcOx) resultierte in einem hohen Background (20-30 %) und extrem flachen Standardkurven, die die quantitative Auswertung des Tests erschwerten. Zur Synthese homologer Festphasenantigene wurde Ampicillin über EDPC an GlcOx und OVA gekoppelt, wobei verschiedene molare Verhältnisse eingesetzt wurden (1:10, 1:50, 1:100; Ansatz I, II, III). Die Charakterisierung dieser Konjugate ergab, dass teilweise hohe Protein-Konzentrationen zur Plattenbeschichtung notwendig waren, um in angemessener Zeit den Enzym-Substratumsatz zu gewährleisten. Dadurch kam es jedoch zu einer tendenziellen Verschlechterung der Test-Empfindlichkeit, insbesondere bei Verwendung von Ansatz I. Bei den mit höheren Hapten-Konzentrationen hergestellten Festphasenantigenen (Ansätze II und III) konnten niedrigere Arbeitskonzentrationen eingesetzt werden, die erreichte Testsensitivität lag jedoch noch oberhalb des gesetzlich vorgeschriebenen Höchstwertes.

Bei Verwendung des optimierten Testsystems (Ansatz II) betrug die Nachweisgrenze 6 ng/ml und lag damit deutlich schlechter als die im direkten System ermittelte Sensitivität (1 ng/ml). Das entsprechende Festphasenantigen (Ansatz II) wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml bzw. 150 ng/ml (für Standardkurven in PBS bzw. in Milch) eingesetzt, das Antiserum wurde 1:1000 (für PBS) bzw. 1:2000 (für Milch) verdünnt. Diese Proteinkonzentration liegt, verglichen mit der im direkten System verwendeten Enzymkonjugat-Konzentration von ca. 1,6 µg/ml, bei Berücksichtigung der molaren Verhältnisse (MG HRP: 40 000; MG GlcOx: 160 000), um ca. Faktor 2 (für Milch) bzw. 6 (für PBS) niedriger. Obwohl zur Synthese von Ampicillin-HRP bzw. -GlcOx die gleiche Kopplungsmethode und teilweise gleiche molare Verhältnisse (Ansatz III) eingesetzt wurden, scheint somit eine höhere Affinität des Antiserums zum Festphasenantigen vorzuliegen. Die Gründe hierfür sind unklar. Vorstellbar wären sterische Veränderungen des immobilisierten Hapten-Protein-Komplexes (Degradation des Haptens) während der relativ langen Zeitspanne, die das Beschichten der Mikrotiterplatten in Anspruch nimmt (mind. 20 h). Das HRP-markierte Ampicillin dagegen bleibt während der Durchführung des direkten ELISAs nur 2 h bei Raumtemperatur auf der Mikrotiterplatte. Hierbei ist auch anzumerken, dass es sich bei Penicillinen aus chemischer Sicht um äußerst labile Substanzen handelt, deren vollständiger, jedoch oft auch unvollständiger Abbau durch verschiedenste Faktoren hervorgerufen werden kann (BERGER, 1992). Der Einsatz des im direkten System verwendeten Enzymkonjugates als Festphasenantigen (nach Hemmung der enzymatischen Aktivität) für einen indirekten Assay könnte zur Abklärung dieses Phänomens beitragen.

Auch durch Modifikationen im Testablauf (Variation der Inkubationszeiten und -temperatur, Verwendung stabilisierender Pufferzusätze, konsekutive Testanordnung), konnte keine Verbesserung der Testergebnisse erzielt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Letztendlich finden sich auch in der Literatur nur sehr widersprüchliche Angaben zum unterschiedlichen Verhalten von Antikörpern in direkten und indirekten Testsystemen, eine abschließende Klärung dieser Problematik ist daher kaum möglich. Festzuhalten bleibt jedoch, dass durch die Verwendung lumineszierender Substrate mit Enhancer-Funktion, die den Einsatz niedrigerer Konzentrationen an Immunreagenzien ermöglichten, die gewünschte Testsensitivität erreicht werden konnte.

Der Vergleich der relativen Kreuzreaktivität des polyklonalen Antiserums im direkten und indirekten Testformat zeigt, dass für einzelne Substanzen, z.B. Ampicillin und Cloxacillin, um bis zu 30 % unterschiedliche Reaktivitäten festgestellt wurden. Ein ähnliches Verhalten zeigte in orientierenden Versuchen das von LITZ (1995) entwickelte polyklonale Antiserum zum gruppenspezifischen Penicillin-Nachweis, während der monoklonale Antikörper gegen Ampicillin dagegen in beiden Testformaten identische Spezifitätsmuster aufwies. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Serum verschiedene Antikörperpopulationen enthält, die auch für die divergierenden Testempfindlichkeiten in den verschiedenen Testanordnungen verantwortlich sein könnten.

Für den Nachweis von Ampicillin mittels **monoklonalem Antikörper** wurden wiederum homologe und heterologe Festphasenantigene eingesetzt und ihr Einfluß auf die Sensitivität des indirekten Testformats überprüft. Die Konjugate unter Verwendung von Ampicillin als Zielantibiotikum erwiesen sich erstaunlicherweise als ungeeignet für den Nachweis von Ampicillin. Erst bei sehr hohen Immunreagenzien-Konzentrationen konnte eine Reaktion zwischen Antikörper und immobilisiertem Antigen gemessen werden (Coating-Antigene OVA bzw. GlcOx und Antikörper jeweils über 2 µg/ml), dies ging jedoch mit einem Verlust der Sensitivität einher. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Verwendung des Metampicillin-GlcOx gemacht, während sich Epicillin-GlcOx als besser geeignet erwies. Dies ist insofern interessant, da der Antikörper mit freiem Epicillin eine sehr hohe Kreuzreaktivität von > 100 % aufwies (DIETRICH et al., 1998). Diese hohe Affinität ließ eine Verlagerung der Antigen-Antikörperreaktion zu Gunsten des immobilisierten Haptens vermuten; durch die Kopplung des Haptens an das Protein wurde jedoch offensichtlich die Bindungsstelle der monoklonalen Antikörper an das immobilisierte Epicillin stark verändert. Mit diesem Testsystem wurde eine Nachweisgrenze von ca. 7 ng/ml ermittelt. Dies erlaubt zwar nicht den Nachweis von Ampicillin in Milch auf MRL-Niveau, übertrifft jedoch die Empfindlichkeit des Antikörpers bei direkter Testanordnung (12 ng/ml nach DIETRICH et al., 1998). Signifikante Kreuzreaktionen konnten nur für Amoxicillin (108 %), Epicillin (130 %), Metampicillin (19 %) sowie Penicillin V und Piperacillin (ca. 10 %) bestimmt werden und entsprachen, wie bereits erwähnt, den mit dem direkten Format gemessenen Werten.

Hervorzuheben ist für alle überprüften Antikörper gegen Penicilline, dass im Gegensatz zu vielen publizierten Enzymimmuntests (VAN DORPE et al., 1996; GAUDIN et al., 2001; GRUBELNIK et al., 2001) keine Reaktionen mit hydrolysierten Penicillinen gemessen werden konnten. Ampicillin wurde somit unter Vermeidung einer Ringöffnung an das zur Immunisierung verwendete Protein gekoppelt und induzierte die Bildung von Antikörpern gegen die unveränderte Muttersubstanz.

Der ELISA zum Nachweis von Cloxacillin wurde von DIETRICH et al. (1996) bereits als indirektes System konzipiert. Die Leistungsmerkmale des in dieser Arbeit erstellten Assays wichen nur geringfügig von DIETRICH et al. (1996) ab.

4.2.2 Nachweis von Streptomycin

Da Streptomycin keine zur Kopplung an Proteine geeigneten funktionellen Gruppen besitzt, wurde das Molekül zunächst derivatisiert (SCHNAPPINGER, 1992). Die daraus resultierenden Derivate, Streptomycin-Oxim bzw. Streptomycin-Hydrazon, wiesen eine freie Carboxyl- bzw. Aminogruppe auf, die zur Kopplung an ein Trägerprotein verwendet wurde. Insgesamt konnten vier verschiedene Festphasenantigene synthetisiert werden, die mit dem monoklonalen Antikörper auf ihre Eignung untersucht wurden. Es zeigte sich, dass das mittels Carbodiimid-Methode hergestellte Streptomycin- β -Casein in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt werden mußte (2,5 μ g/ml), um eine ausreichende Extinktion des antigen-freien Kontrollansatzes hervorzurufen, womit der praktische Nutzen dieses Coating-Antigens begrenzt ist. Die ebenfalls über EDPC gekoppelten Beschichtungs-Antigene Streptomycin-GlcOx und -OVA konnten dagegen in deutlich niedrigeren Konzentrationen (300 bzw. 600 ng/ml) eingesetzt werden, mit einer Charge lassen sich somit mehrere Tausend Mikrotiterplatten beschichten. Bei der Verwendung des mittels Perjodat gekoppelten Streptomycin-GlcOx konnten im Hinblick auf die Parameter Sensitivität und Intra-assay-Reproduzierbarkeit die besten Ergebnisse im Mikrotiterplatten-Format erzielt werden. Die Nachweisgrenze für Streptomycin lag bei 2 ng/ml und befand sich erwartungsgemäß in einer ähnlichen Größenordnung wie die des direkten ELISA (MÄRTLBAUER et al., 1994). Auch CHIU et al. (1995) testeten monoklonale

Antikörper (gegen PCBs) in verschiedenen Testformaten und konnten keine signifikanten Abweichungen in der Sensitivität zwischen direktem und indirektem Assay feststellen.

In einer Studie zur Überprüfung der Stabilität der Coating-Antigene (Ergebnisse nicht dargestellt) wies das Streptomycin-ABH-Konjugat allerdings die geringste Belastbarkeit auf. Dies ist möglicherweise auf eine Instabilität der zur Kopplung verwendeten derivatisierten Gruppe (Hydrazon) nach Lichteinfluß zurückzuführen (HERMANSON, 1996). Daher wurde auf dem Biochip später das über Carbodiimid gekoppelte Streptomycin-Oxim-GlcOx implementiert.

Als einziges Aminoglykosid-Antibiotikum zeigte Dihydrostreptomycin eine ausgeprägte Kreuzreaktion im Einzel- bzw. im Multitest (76 % bzw. 114 %), dies sind etwas höhere Werte als die im direkten Testformat (63 %) ermittelten. Diese ausgeprägte Kreuzreaktivität war zu erwarten, da der einzige strukturelle Unterschied gegenüber dem Streptomycin im Austausch der Aldehydgruppe am C3'-Atom durch eine CH₂OH-Gruppe und somit an der Kopplungsstelle selbst liegt. Dadurch kam dem Streptidin-Rest mit seinen Guanidin-Gruppen - und somit der am weitesten von der Kopplungsstelle entfernt liegende und als antigene Determinante wirkende Teil des Moleküls (LANDSTEINER, 1946) - bei der Immunisierung der Versuchstiere die Spezifität-bestimmende, immunogene Bedeutung zu. Die von MITCHELL et al. (1992) sowie SCHNAPPINGER (1992) beschriebenen polyklonalen Antiseren gegen Streptomycin wiesen ebenfalls hohe Kreuzreaktionen mit Dihydrostreptomycin auf.

4.2.3 Nachweis von Sulfonamiden

Sulfadiazin und Sulfamethazin wurden zum einen direkt über ihre primäre Aminogruppe an Trägerproteine gekoppelt, zum anderen wurde die Aminogruppe zuvor mit Bernsteinsäure-Anhydrid derivatisiert. HAASNOOT et al. (2000) erzielten mit dieser Modifikation höhere Empfindlichkeiten ihres Testsystems. Im Hinblick auf eine mögliche Steigerung der Testempfindlichkeit wurden zudem verschiedene Kopplungsverhältnisse überprüft (Perjodatkopplung, Ansatz I und II). Ansatz I (molares Verhältnis Protein:Analyt 1:2000) erwies sich für beide Nachweise als unpraktikabel, da bei der Testdurchführung relativ hohe

Konzentrationen dieses Konjugates (1,2 µg/ml) verwendet werden mußten. Ein weites Kopplungsverhältnis (Ansatz II, 1:8000) erwies sich für den Sulfadiazin (SDA)-Antikörper als vorteilhaft. Die so hergestellten Festphasenantigene konnten im ng-Bereich eingesetzt werden, was in einer Steigerung der Empfindlichkeit resultierte.

Die Arbeitskonzentrationen der unter Verwendung von Carbodiimid hergestellten SDA-Festphasenantigene lagen zwar im unteren ng-Bereich, bei Einsatz von Milch wurde jedoch ein unverträglich hoher Background registriert. Ebenso ungeeignet erwies sich der Kopplungsansatz unter Verwendung von Carbonyldiimidazol. Wiederum mußten unverhältnismäßig hohe Konzentrationen an Coating-Antigen und Antikörper (3 bzw. 4 µg/ml) eingesetzt werden, um ausreichende Absorptionswerte zu erreichen. Grund hierfür dürfte sein, dass Carbonyldiimidazol als sog. "Zero-length-crosslinker" keinen ausreichend großen Abstand zwischen Trägerprotein und SDA schafft, so dass das Sulfonamid vom Antikörper nur schwer zu erkennen ist (WONG, 1993).

Im Gegensatz hierzu konnten für den Nachweis von Sulfamethazin die höchsten Empfindlichkeiten unter Verwendung des an GlcOx gekoppelten derivatisierten Sulfamethazins als Beschichtungsantigen erreicht werden. Nach JOCKERS et al. (1993) werden in kompetitiven Systemen die höchsten Empfindlichkeiten erzielt, wenn die Antikörper eine geringere Affinität für den Kompetitor als für die Zielsubstanz aufweisen. Das derivatisierte SMA wirkte hier als schwacher Reaktionspartner für die spezifischen Antikörper, die Reaktion des Antikörpers mit der Festphase kann daher durch freies Sulfonamid leicht unterbunden werden.

Mit den optimierten Systemen für den Nachweis von SDA und SMA wurden Nachweisgrenzen von 9 bzw. 8 ng/ml erzielt und lagen somit um mehr als Faktor 10 unterhalb des vorgeschriebenen MRL-Wertes für Sulfonamide. Im Vergleich zu den bereits früher etablierten direkten Enzymimmuntests konnte hier im Gegensatz zum Nachweis von Streptomycin eine Steigerung der Empfindlichkeit durch Umstellung in ein indirektes Testformat erreicht werden. Die Kreuzreaktivität der Testsysteme mit anderen Sulfonamiden wurde im wesentlichen durch die heterozyklischen Substituenten des Sulfanilamids bestimmt, da die aromatische Aminogruppe (N_4) zur Kopplung an Proteine (für die Immunisierung sowie als

Festphasenantigene) verwendet wurde. Bevorzugte Reaktionspartner des Sulfadiazin-Antikörpers waren Sulfathiazol und Sulfamerazin mit jeweils ca. 10 % Kreuzreaktion sowie Sulfapyridin mit ca. 3 %. Die höchste Kreuzreaktion konnte für Sulfasalazin bestimmt werden (50 % in PBS), wobei dafür die zusätzliche Struktur am N₄ verantwortlich gemacht werden kann (MÄRTLBAUER et al., 1994). Diese zeigt Ähnlichkeit mit der Glutaraldehyd-Brücke des Immunogens (SDA-BSA), die nun wiederum von den Antikörpern wiedererkannt wird und zu einer Steigerung der Affinität führt. Im ELISA für SMA konnte eine signifikante Kreuzreaktion nur mit Sulfamerazin gemessen werden. Diesem Sulfonamid fehlt im Unterschied zu Sulfamethazin eine Methylgruppe am C₄-Atom des Pyrimidinyl-Ringes, der Rest der beiden Moleküle ist identisch. Dieses Spezifitätsmuster deckt sich auch mit den von FLEEKER und LOVETT (1985) und SINGH et al. (1989) beschriebenen Enzymimmunoassays zum Nachweis von Sulfamethazin. Im Hinblick auf einen simultanen Einsatz der Immunreagenzien erwies sich die fehlende Kreuzreaktion zwischen SDA- und SMA-Reagenzien in den indirekten Assays von besonderem Vorteil. So kann die Problematik der "shared reactivity" (BERZOFKY und SCHECHTER, 1981) vermieden werden. Würde mehr als ein Antikörper an ein immobilisiertes Hapten binden, könnte dies zur Entstehung einer doppelt-sigmoidalen Kurve führen.

Prinzipiell wäre es jedoch auch wünschenswert, neben hochspezifischen monoklonalen Antikörpern auch sog. "generische Antikörper" zum Nachweis aller Sulfonamide, idealerweise bereits auf Erzeugerebene, zur Verfügung zu haben. Dies könnte die Erfassung aller potentiellen Sulfonamidrückstände ermöglichen und in hohem Maße zur Sicherung der Qualität von Milch und Milchprodukten beitragen. HAASNOOT et al. (2000) gelang die Entwicklung eines solchen Antikörpers gegen die aromatische Aminogruppe der Sulfonamide, welcher mit neun verschiedenen Sulfonamiden kreuzreagierte. Jedoch lagen die erreichten Sensitivitäten zu weit auseinander, um alle Sulfonamide auf dem gleichen Konzentrationslevel nachweisen zu können.

4.3 Anwendung der Enzymimmunoassays

4.3.1 Untersuchung künstlich kontaminierter Milch und hemmstoffpositiver Praxisproben

Die mit Abstand größte Bedeutung unter den in Milch vorkommenden Tierarzneimittel-Rückständen kommt immer noch den Penicillinen zu (MORETAIN und FROGER, 1995; MILCHPRÜFRING BAYERN e.V., 2001). Daher wurden der gruppenspezifische ELISA zum Nachweis von Penicillinen und der auf monoklonalen Antikörpern basierende Cloxacillin-ELISA sowie der Streptomycin-ELISA (zur Erfassung von Rückständen in Milch von mit Penicillin-Streptomycin-Kombinationspräparaten behandelten Tieren) auf ihre Praxistauglichkeit untersucht. Die Validierung erfolgte im Falle des Penicillin-ELISAs anhand künstlich kontaminierter Milchproben, für den Cloxacillin- bzw. Streptomycin-ELISA lagen entsprechende Daten bereits vor (DIETRICH et al., 1996; SCHNAPPINGER et al., 1996).

Die Wiederfindungsraten für Penicillin G in einem Dotierungs-Bereich von 1-32 ng/ml lagen bei durchschnittlich 90 %. Die Variationskoeffizienten entsprachen mit 30-40 % der vom Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food geforderten Reproduzierbarkeit für Rückstands-Analysen im Bereich von $\geq 1 \mu\text{g/kg} \leq 10 \mu\text{g/kg}$ (CCRVDF, 2003). Auch die anderen, mit einem MRL-Wert belegten Penicilline (Ampi-, Amoxi-, Oxa-, Cloxa-, Dicloxa- und Nafcillin) wurden unter Verwendung einer Penicillin G-Standardkurve auf bzw. unter dem entsprechenden Höchstwert positiv getestet. Falsch-negative Ergebnisse traten nicht auf und sind auch aufgrund der kompetitiven Testanordnung sehr unwahrscheinlich (MÄRTLBAUER, 1993). Verglichen mit dem von FLOß (1997) beschriebenen ELISA zum Nachweis von Penicillinen, für den die Proben entfettet und verdünnt werden mußten, oder mit DIXON-HOLLAND und KATZ (1989), die Milchproben vor der enzymimmunologischen Untersuchung auf Sulfamethazin einer Säurefällung mit nachfolgender pH-Adjustierung unterziehen mußten, ist die hier notwendige Entfettung eine vergleichsweise einfache Maßnahme zur Vermeidung unspezifischer Einflüsse auf das Testsystem.

Für die weitere Validierung wurden Hemmstoff-positive und negative Anlieferungsmilchproben aus der Tätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. (MPR) untersucht. Die Übereinstimmung zwischen dem Penicillin-ELISA und dem BRT-Hemmstofftest war gut. Im BRT-Test negative Proben waren auch in den enzymimmunologischen Testsystemen negativ bzw. nur schwach positiv, d.h., die ermittelten Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze des BRT-Tests von 2 ng Penicillin G/ml. Für einige im Hemmstofftest positive, im ELISA jedoch negative Proben lagen Hinweise auf Cephalosporine bzw. Rückstände anderer antimikrobiell wirkender Arzneimittel vor. Dies verdeutlicht, dass andere Substanzklassen bei der Untersuchung von Milch auf Tierarzneimittelrückstände nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Das Vorkommen verschiedener Antiinfektiva in Tankwagenmilch wird durch die differenzierenden Untersuchungen von SUHREN et al. (1996) belegt. Auch Höchstmengenüberschreitungen um ein Vielfaches des MRL-Wertes - die maximal ermittelte Konzentration für Penicilline lag bei 4000 ng/ml, der MRL-Wert für Penicillin G ist 4 ng/ml - heben die Bedeutung regelmäßiger Hemmstoffuntersuchungen hervor. Kontrollen auf Erzeugerebene könnten zudem zur Vermeidung von Kontaminationen der gesamten Anlieferungsmilch durch die Milch eines einzelnen Betriebes beitragen.

4.3.2 Simultaner Nachweis der Antiinfektiva auf der Mikrotiterplatte und mittels Biosensor

Zum parallelen Nachweis von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Cloxacillin und Ampicillin in Milch auf einer Mikrotiterplatte wurde ein Multianalyt-Schnelltest entwickelt, der eine Verkürzung der Gesamttestzeit um fast 90 % im Vergleich zum herkömmlichen ELISA-Protokoll ermöglicht. Da hierfür die Immunreagenzien in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden mußten (vgl. Tab. 13 und 21), war eine Abnahme der Testempfindlichkeit unvermeidbar (STANKER und BEIER, 1996). Die hochsensitiven monoklonalen Antikörper ermöglichten dennoch eine Nachweisbarkeit unterhalb der entsprechenden MRL-Werte. Für Ampicillin konnte der qualitative Nachweis jedoch nur ab dem vierfachen MRL-Wert gewährleistet werden.

Der entwickelte Test ermöglicht somit den parallelen und semiquantitativen Nachweis verschiedener Substanzklassen von Antiinfektiva in einem Untersuchungsgang - ein Kriterium, das bislang nur von den mikrobiologischen Hemmstofftests erfüllt wurde, wobei der Geräte-unabhängige Multianalyt-Schnelltest für die implementierten Nachweise deutliche Vorteile hinsichtlich der Testdauer und -empfindlichkeit aufweist.

Weiterhin wurde durch den Einsatz der neu entwickelten Immunreagenzien die Realisierung eines Biosensors, basierend auf einem sog. Parallelen Affinitätssensor-Array (WELLER et al., 1999), ermöglicht, der die simultane Detektion verschiedener Antibiotikarückstände in Milch mittels einer einzigen, automatisierten Messung erlaubt. In ersten Versuchen zum Nachweis ausgewählter Antiinfektiva (Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfmethazin und Cloxacillin) konnte gezeigt werden, dass die erzielten Empfindlichkeiten den im klassischen Enzymimmuntest erzielten Ergebnissen nicht nennenswert nachstanden (KNECHT et al., 2002), während die Testdauer drastisch auf 5 min reduziert werden konnte. Die generelle Konzeption des Biosensors erlaubt eine praktisch unbegrenzte Integration weiterer Tests für zukünftige Anwendungen und kommt somit der Idealvorstellung, nämlich den sensitiven Nachweis möglichst vieler potentieller Arzneimittelrückstände in einer Untersuchung, sehr nahe.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Antiinfektiva in Milch, die die Grundlage für die Etablierung eines Biosensor-Systems zur “on-line”-Erfassung von Arzneimittelrückständen in Milch darstellten.

Zur Gewinnung von gruppenspezifischen Antikörpern gegen Penicilline wurden Kaninchen mit einem Ampicillin-BSA-Konjugat immunisiert. Mit dem erhaltenen Antiserum wurde ein **direkter kompetitiver Enzymimmuntest (EIA)** entwickelt, der eine Nachweisgrenze von 1 ng/ml für Penicillin G in Milch aufwies. Durch die hohe Gruppenspezifität war zudem die Detektion aller mit einem MRL-Wert belegten Penicilline (Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin) auf bzw. unterhalb der entsprechenden Höchstwerte (4 bzw. 30 ng/ml) möglich. Die praktische Anwendbarkeit des erstellten Enzymimmuntests wurde anhand künstlich kontaminierter Milch sowie positiv getesteter Praxisproben (n = 321) überprüft.

Zur Etablierung **indirekter kompetitiver enzymimmunologischer Verfahren** zum Nachweis von Streptomycin, Sulfonamiden und Penicillinen wurden bereits bestehende, auf monoklonalen Antikörpern basierende, direkte EIAs auf ein indirektes Format umgestellt. Hierfür wurde eine breite Palette an Festphasenantigenen aus den jeweiligen Zielantibiotika und Trägerproteinen synthetisiert. Nach Optimierung der Testempfindlichkeit und Überprüfung der Spezifität, konnten für alle untersuchten Analyten indirekte EIAs entwickelt werden, die die Höchstmengenvorgaben für Antiinfektiva in Milch nach VO (EWG) 2377/90 weitgehend erfüllten. Für Ampicillin und Penicillin G lag die Nachweisgrenze unter Verwendung eines chromogenen Substrates mit 7 und 6 ng/ml oberhalb des MRL-Wertes (4 ng/ml), durch Verwendung eines lumineszierenden Substrates konnte jedoch eine Steigerung der Empfindlichkeit erreicht werden.

Basierend auf den optimierten indirekten EIAs wurden **Multianalyt-Schnelltests** sowohl in der **Mikrotiterplatte** als auch auf einem **Microarray-Chip** entwickelt. Aufgrund der geänderten Versuchsbedingungen wurden die Systeme erneut optimiert und hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität charakterisiert. Die auf dem Biochip erreichten Empfindlichkeiten standen den auf Mikrotiterplatten erzielten Ergebnissen nicht entscheidend nach, die Testdauer konnte auf 15 min (Mikrotiterplatte) bzw. 5 min (Chip) reduziert werden.

SUMMARY

Development of a biosensor system for the detection of antibiotics and sulfonamides in milk - production of the immunochemical components

This paper describes the development and application of enzyme immunoassays for the detection of antimicrobials in milk, aiming at the establishment of a biosensor system for the on-line analysis of drug residues in milk.

For the development of group-specific antibodies against penicillins rabbits were immunized with an ampicillin-BSA-conjugate. The resulting antiserum was employed for the development of a **direct competitive enzyme immunoassay (EIA)**, giving a detection limit of 1 ng/ml for penicillin G in milk. Due to broad cross-reactivities the sensitive detection of those penicillins regulated by MRLs within the European Union (ampicillin, amoxicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin and nafcillin) was enabled. The practical use of the enzyme immunoassay was demonstrated by analyzing artificially contaminated and violative incurred milk samples (n = 321).

For the development of **indirect competitive enzyme immunoassays** for the detection of streptomycin, sulfonamides and penicillins, previously established direct assays, based on monoclonal antibodies, were adapted to indirect formats. For this purpose a wide range of coating-antigens was prepared by linking haptens to carrier-proteins. After optimizing test sensitivity and characterizing the test specificity indirect EIAs could be developed for each antimicrobial compound, fulfilling the MRL requirements due to EU regulation 2377/90. Only for ampicillin and penicillin G colorimetric measurements resulted in detection limits of 7 and 6 ng/ml, respectively, which were slightly above the MRL of 4 ng/ml. By using a luminescent substrate, however, the MRL could be reached for these antibiotics as well.

Based on the results of the individual EIAs **rapid multianalyte tests** both on **microtitre plates** and planar **microarray chips** were developed. Due to altered assay conditions again the systems were optimized and characterized regarding sensitivity and specificity. The sensitivities achieved on the biochip were well comparable with those obtained in the microtitre plate, whereas total assay time could be reduced to 15 min (microtitre plate) and 5 min (biochip), respectively.

ABJEAN, J.-P. (1997):

Planar chromatography for the multiclass, multiresidue screening of chloramphenicol, nitrofurantoin, and sulfonamide residues in pork and beef

J. AOAC Int. 80, 737-740

ABJEAN, J.-P. und V. LAHOGUE (1997):

Planar chromatography for quantitative determination of ampicillin residues in milk and muscle

J. AOAC Int. 80, 1171-1176

ABRAHAM, E. P. (1983):

History of β -lactam antibiotics

In: A. L. DEMAİN und E. P. ABRAHAM: Antibiotics containing the β -lactam structure, Kap. 1, pp.1-19

Springer Verlag

AHLERS, D. und P. ANDRESEN (1971):

Therapie-Versuche mit "Trimethoprim/S" bei fieberhaften Mastitiden, Puerperalstörungen und Säuglingskrankheiten des Rindes

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 201-232

AIM (Analytik in Milch GmbH), München (1999):

Brilliant-schwarz-Reduktionstest, Basisinformation und Hintergründe, BRT Hemmstofftest
Produktinformation

ALLISON, J. R. D. (1985):

Antibiotic residues in milk

British Vet. Journal 141, 9-16

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

BADR, A. (1982):

Cytogenic activities of 3 sulphonamides

Mutation Research 104, 95-100

BALBI, G. M. und P. A. HARTMAN (1985):

Highly sensitive paper-disc assays for detecting penicillin in milk

J. Food Prot. 48, 16-20

BARNETT, M. und S. R. M. BUSHBY (1970):

Trimethoprim and the sulphonamides

Vet. Rec. 87, 43-51

BAXTER, G. A., J. P. FERGUSON, M. C. O'CONNOR und C. T. ELLIOTT (2001):

Detection of streptomycin residues in whole milk using an optical immunobiosensor

J. Agric. Food Chem. 49, 3204-3207

BERGER, K. (1992):

Analytik von Penicillinrückständen - Methodische Entwicklung zur Derivatisierung,
Hochdruckflüssig- und Immunaффinitätschromatographie

Diss. rer. nat., Wuppertal

BERZOFSKY, J. A. und A. N. SCHECHTER (1981):

The concepts of crossreactivity and specificity in immunology

Mol. Immunol. 18, 751-763

BEYER, F. (1986):

Hemmstoffe in Milch aus technologischer Sicht

Dtsch. Molkerei-Ztg. 107, 989-899

BLACKMORE, D. J., R. JACKMAN und J. A. MORRIS (1988):

Method for the production of antigenic protein-hapten conjugates and antibodies corresponding thereto

Patent Publication No. EP 0 309 299 A1

BOER, E. De und R. R. BEUMER (1999):

Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms

Int. J. Food Microbiol. 50, 119-130

BOUJTITA, M., J. P. HARR und R. PITTSON (2000):

Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screenprinted electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer

Biosensors and Bioelectronics 15, 257-263

BOUVRETTE, P., K. B. MALE, J. H. T. LUONG und B. F. GIBBS (1997):

Amperometric biosensor for diamine using oxidase purified from porcine kidney

Enzyme Microb. Technol. 20, 32-38

BRADY, M. S., N. WHITE und S. E. KATZ (1993):

Resistance development potential of antibiotic/antimicrobial residue levels designated as "safe levels"

J. Food Prot. 56, 229-233

BRECHT, A. und R. ABUKNESHA (1995):

Multi-analyte immunoassay application to environmental analysis

Trends in Anal. Chem. 14, 361-371

BRUNO, F., R. CURINI, A. Di CORCIA, M. NAZZARI und R. SAMPERI (2001):
Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace
determination of β -lactam antibiotics in bovine milk
J. Agric. Food Chem. 49, 3463-3470

BUSHBY, R. M. (1980):
Sulfonamide and trimethoprim combinations
JAVMA 176, 1049-1053

CARLSSON, Å. und L. BJÖRCK (1989):
Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P
J. Dairy Sci. 72, 3166-3175

CASS, A. E. G. (1990):
Biosensors - a practical approach
IRL Press, Oxford

CCRVD, Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in foods (2003):
Review of performance-based criteria for methods of analysis for veterinary drug residues in
food
Joint FAO/WHO food standards programme, 14. Sitzung des CCRVD, 4.-7. März, Washington

CHARM SCIENCES Inc., Malden, MA, USA (1993):
Charm AIM-96 Hemmstofftest
Produktinformation

CHEN, H. C. und T. C. CHANG (1994):
Detection of penicillin G in milk using a conductimetric method
J. Dairy Sci. 77, 1515-1520

CHIAVARINO, B., M. E. CRESTONI, A. Di MARZIO und S. FORNARINI (1998):
Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission
detection

J. Chromatogr. B 706, 269-277

CHIU, Y.-W., R. E. CARISON, K. L. MARCUS und A. E. KARU (1995):

A monoclonal immunoassay for the coplanar polychlorinated biphenyls

Anal. Chem. 67, 3829-3839

CHR. HANSEN GmbH, Nienburg/Weser (o.J.):

βeta s.t.a.r 25 und βeta s.t.a.r. 100, Sensitivity of the test in comparison to MRL's;

Penzym 50

Produktinformationen

CRIBB, A. E. und S. P. SPIELBERG (1992):

Sulfamethoxazole is metabolized to the hydroxylamine in humans

Clin. Pharmacol. Ther. 51, 522-526

DASENBROCK, C. O. und W. LaCOURSE (1998):

Assay for cephapirin and ampicillin in raw milk by high-performance liquid chromatography -
integrated pulsed amperometric detection

Anal. Chem. 70, 2415-2420

DAVIS, J., D. H. VAUGHAN und M. F. CARDOSI (1995):

Elements of biosensor construction

Enzyme Microb. Technol. 17, 1030-1035

DEWDNEY, J. M., L. MAES, J. P. RAYNAUD, F. BLANC, J. P. SCHEID, T. JACKSON, S. LENS und C. VERSCHUEREN (1991):

Risk assessment of antibiotic residues of β -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential

Fd. Chem. Tox. 29, 477-483

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1996):

Use of monoclonal antibodies for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk

In: HAAGSMA, N. und A. RUITER: Euroresidue III: conference on residues of veterinary drugs in food, 6-8 May, 1996, pp. 382-386

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1998):

The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins

Analyst 123, 2749-2754

DIXON-HOLLAND, D. E. und S. E. KATZ (1988):

Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1137-1140

DOMAGK, G. (1935):

Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen

Dtsch. Med. Wschr. 7, 250-256

DÜRCKHEIMER, W., J. BLUMBACH, R. LATTRELL und K. H. SCHEUNEMANN (1985):

Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der β -Laktam-Antibiotika

Angew. Chem. 97, 183-205

EDDER, P., A. COMINOLI und C. CORVI (1999):

Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection

J. Chromatogr. A 830, 345-351

EKINS, R. P. (1985):

Current concepts and future developments

In. COLLINS, W. P.: Alternative immunoassays, pp. 219-237

Wiley & Sons, Chichester u.a.

EKINS R. P., F. CHU und J. MICALLEF (1989):

High specific activity chemiluminescent and fluorescent markers: their potential application to high sensitivity and "multi-analyte" immunoassay

J. Bioluminescence Chemiluminescence 4, 59-78

ELIOPOULOS, G. M., B. F. FARBER, B. E. MURRAY, C. WENNERSTEIN und R. C. MOELLERING JR. (1984):

Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates

Antimicrob. Agents Chemother. 25, 398-399

EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1997 und 2000):

Summary reports for penicillins and aminoglycosides of the committee for veterinary medicinal products

London, UK

FITZPATRICK, J., L. FANNING, S. HEARTY, P. LOENARD, B. M. MANNING, J. Q. QUINN und R. O'KENNEDY (2000):

Applications and recent developments in the use of antibodies for analysis

Analytical Letters 33, 2563-2609

FLEEKER, J. R. und L. J. LOVETT (1985):

Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 172-174

FLEMING, A. (1929):

On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*

Br. J. Exp. Pathol. 10, 226-236

FLOß, M. (1997):

Anwendung enzymimmunchemischer Testsysteme zum Nachweis von Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation

Diss. med. vet. München

FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE (1996):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Kap. 30, pp. 677-715

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg u.a.

FRÁNEK, M., V. KOLÁŘ, A. DENG und S. CROOKS (1999):

Determination of sulphadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA

Food Agric. Immunol. 11, 339-349

FREY, H.-H. und W. LÖSCHER (1996):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 1. Auflage, Kap. 16, pp. 462-470

Enke Verlag, Stuttgart

FURUSAWA, N. und K. KISHIDA (2001):

High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk

Fresenius J. Anal. Chem. 371, 1031-1033

GARCIA, J. L., C. J. NUNEZ, E. G. GONZALEZ, J. OSUNA, X. SOBERON und E. GALINDO (1998):

Microbial sensor for new-generation cephalosporins based in a protein-engineered β -lactamase
Appl. Biochem. Biotechnol. 73, 243-256

GAUDIN, V. und M.-L. PAVY (1999):

Determination of sulfamethazine in milk by biosensor immunoassay

J. AOAC Int. 82, 1316-1320

GAUDIN, V., J. FONTAINE und P. MARIS (2001):

Screening of penicillin residues in milk by surface plasmon resonance-based biosensor assay:
comparison of chemical and enzymatic pre-treatment

Anal. Chimica Acta 436, 191-198

GERHARDT, G. C., C. D. C. SALISBURY und J. D. MACNEIL (1994):

Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in animal tissue by on-line sample
enrichment liquid chromatography

J. AOAC Int. 77 (2), 334-337

GILDOW, E. M., D. L. FOURT und A. O. SHAW (1938):

Sulfanilamide in the treatment of streptococcic mastitis

J. Dairy Science 21, 759-766

GIST-BROCADES GmbH, Dortmund, (o.J.):

Delvotest®-Standard Diffusionstest zum Nachweis von antibakteriellen Substanzen in Milch,

Delvotest® SP 5 Pack

Produktinformation

GRUBELINK, A., C. PADESTE und L. TIEFENAUER (2001):

Highly sensitive enzyme immunoassays for the detection of β -lactam antibiotics

Food Agric. Immunol. 13, 161-169

HAASNOOT, W., J. DU PRE, G. CAZEMIER, A. KEMMERS-VONCKEN, R. VERHEIJEN
und B. J. M. JANSEN (2000):

Monoclonal antibodies against a sulfathiazole derivative for the immunochemical detection of
sulfonamides

Food Agric. Immunol. 12, 127-138

HAASNOOT, W., F. KOHEN, J. Du PRÉ, G. CAZEMIER, A. KEMMERS-VONCKEN, M.
BIENENMANN-PLOUM und R. VERHEIJEN (2000):

Application of generic monoclonal antibodies against sulfonamides in optical biosensors

In: van GINKEL, L. A. und A. RUITER: Euroresidue IV: conference on residue of veterinary
drugs in food, 8-10 May, 2000, pp. 501-505

HARTEVELD, J. L. N., M. S. NIEUWENHUIZEN und E. R. J. WILS (1997):

Detection of Staphylococcal Enterotoxin B. Employing a piezoelectric crystal immunosensor

Biosensors and Bioelectronics 12, 661-667

HEALY, B. G., L. LI und D. R. WALT (1997):

Multianalyte biosensors on optical imaging bundles

Biosensors and Bioelectronics 12, 521-529

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

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera

Appl. Microbiol. 25, 26-36

HEESCHEN, W. (1993):

Entwicklung eines integrierten Systems zum Nachweis von Antibiotika, Sulfonamiden und „Hemmstoffen“ in Milch

Welt der Milch 47, 1101-1104

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

Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk

Milchwiss. 51, 154-159

HERMANSON, G. T. (1996):

Bioconjugate Techniques, Kap. 2, pp. 170-171

Academic Press, San Diego

HOLSTEGE, D. M., B. PUSCHNER, G. WHITEHEAD und F. D. GALEY (2002):

Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS

J. Agric. Food Chem. 50, 406-411

HOMOLA, J., S. S. YEE und G. GAUGLITZ (1999):

Surface plasmon resonance sensors: review

Sensors and Actuators B 54, 3-15

HOU, J. P. und J. W. POOLE (1971):

β -Lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure

J. Pharm. Sci. 60, 503-532

IDETEK (1992):

LacTek quality assurance system

Produktinformation, IDETEK Inc., Sunnyvale, USA

IDEXX, Westbrook, Maine, USA (1997):

SNAP® beta-lactam Test-Kit; CITE PROBE; Parallax

Produktinformationen

JACKMAN, R., J. CHESHAM, S. J. MITCHELL und S. D. DYER (1990):

Performance of a rapid ELISA for penicillin G in milk

J. Soc. Dairy Techn. 43, 93-95

JACKSON, T. M. und R. P. EKINS (1986):

Theoretical limitations on immunoassay sensitivity

J. Immunol. Meth. 87, 13-20

JOCKERS, R., F. F. BIER und R. D. SCHMID (1993):

Enhancement of immunoassay sensitivity by molecular modification of competitors

J. Immunol. Meth. 163, 161-167

KELLY, S. C., P. J. O'CONNELL, C. K. O'SULLIVAN und G. G. GUIBAULT (2000):

Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of L-lysine in food

Anal. Chimica Acta 412, 111-119

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

KNECHT, B., M. W. WELLER und R. NIESSNER (2002):

Development of a biosensor for the rapid detection of antibiotics in milk

4th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 4.-7. Juni,
Antwerpen

KNOTHE, H. und G. A. DETTE (1982):

Neben- und Wechselwirkungen wichtiger Antibiotika

Prakt. Tierarzt 9, 815-819

KOCHER, U. (1996):

Nachweis von Streptomycin-Rückständen in Honig mittels Charm II-Test und Absicherung der Befunde durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion

Lebensmittelchemie 50, 112-115

KORPIMÄKI, T., J. ROSENBERG, P. VIRTANEN, T. KARSKELA, U. LAMMINMÄKI, M. TUOMOLA, M. VEHNÄINEN und P. SAVIRANTA (2002):

Improving broad specificity hapten recognition with protein engineering

J. Agric. Food Chem. 50, 4194-4201

KROLL, S. (2000):

Zur Eignung von Schnelltestverfahren zum Rückstandsnachweis von Beta-laktam-Antibiotika in Milch

Diss. med. vet. München

LANDSTEINER (1946):

Specificity of serological reactions

Havard University Press, Cambridge, Mass.

LATHERS, C. M. (2001):

Role of veterinary medicine in public health: antibiotic use in food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance

J. Clin. Pharmacol. 41, 595-599

LESZCZYNSKA, E., S. GLAB, A. SOKOL, K. DZIEGIELEWSKI, R. ROKICKA und R. KONCKI (1998):

Potentiometric biosensor for control of biotechnological production of penicillin G

Anal. Chimica Acta 368, 205-210

LEUW, de P., G. KAPA und M. PETZ (1997):

Induction and characterization of multianalyte antibodies against penicillins in egg yolk

J. AOAC Int. 80, 1220-1228

LITTLEFIELD, N. A., W. G. SHELDON, R. ALLEN und D. W. GAYLOR (1990):

Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: two-generation exposure

Fd. Chem. Toxic. 28, 157-167

LITZ, S. (1995):

Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen

Diss. med. vet. München

LIU, J., L. LI, G. LI, R. HAN und K. CHEN (1998):

H⁺ISFET-based biosensor for determination of penicillin G.

Biosensors and Bioelectronics 13, 1023-1028

LOCHBIHLER, E. (1994):

Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotika und Sulfonamiden in bayerischer Konsum- und Bestandmilch mittels enzymimmunologischer Verfahren

Diss. med. vet. München

LÖSCHER, W. (1984):

Kritische Anmerkungen zu Trimethoprim/Sulfonamid-Kombinationen in der Veterinärmedizin

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 91, 135-139

LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER (1999):

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 4. Auflage, pp. 209-243

Parey Buchverlag, Berlin

MACAULAY, D. M. und V. S. PACKARD (1981):

Evaluation of methods used to detect antibiotic residues in milk

J. Food Prot. 44, 696-698

MARTINEZ GARCIA, E., M. D. MARIN CAMACHES, F. PACHECO MARTINEZ und R. MARTINEZ GAMBIN (1998):

Comparative thin layer chromatographic (TLC) and high performance liquid chromatographic study for the sulfamethazine

Alimentaria 297, 77-81

MÄRTLBAUER (1993):

Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe, pp. 96-140

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

MÄRTLBAUER, E. (1995):

Die Hemmstoffproblematik aus der Sicht der Analytik

Milchwirtschaftliche Berichte 124, 115-119

MÄRTLBAUER, E., E. USLEBER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994):

Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides

Analyst 119, 2543-2548

McCONNELL, R. I., J. V. LAMONT, S. P. FITZGERALD, L. T. FARRY und J. A. MILLS
(2000):

The development of biochip technology for the detection of drug residues

In: van GINKEL, L. A. und A. RUITER: Euroresidue IV: conference on residue of veterinary
drugs in food, 8-10 May, 2000, pp. 746-752

MCS DIAGNOSTICS, Swalmen, NL (1998):

Charm MRL® Test

Produktinformation

MEDINA M. B. und J. J. UNRUH (1995):

Solid-phase clean-up and thin-layer chromatographic detection of veterinary aminoglycosides

J. Chromatogr. B. 663, 127-135

MEETSCHEN, U. und M. PETZ (1991):

Gaschromatographische Analysenmethode für Rückstände von sieben Penicillinen in
Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 193, 337-343

MEIER, R. (1991):

Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von
Sulfonamiden in Milch

Diss. med. vet. München

MELLGREN, C. und Å. STERNESJÖ (1998):

Optical immunobiosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk

J. AOAC Int. 81, 394-397

MELLO, L. D. und L. T. KUBOTA (2002):

Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries

Food Chemistry 77, 237-256

MILCHPRÜFRING BAYERN (2002):

Tätigkeitsberichte 1999, 2000, 2001

Eigenverlag, München

MITCHELL, S. J., R. JACKMAN, M. P. DIBB-FULLER, D. P. MOSWETSI und A. J. BROWN (1992):

Detection of dihydrostreptomycin in milk by ELISA, following intramammary treatment with Streptopen

In: MORGAN, M. R. A., C. J. SMITH und P. A. WILLIAMS: Food safety and quality assurance: application of immunoassay systems, pp. 181-184

Elsevier, London u.a.

MITCHELL, J. M., M. W. GRIFFITHS, S. A. McEWEN, W. B. McNAB und A. J. YEE (1998):
Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance

J. Food Prot. 61, 742-756

MOATS, W. A. (1993):

Detection and semiquantitative estimation of penicillin G and cloxacillin in milk by thin-layer chromatography

J. Agric. Food Chem. 31, 1348-1350

MOATS, W. A. (1999):

Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by β -lactam antibiotics screening tests

J. AOAC Int. 82, 1071-1076

MORETAIN, J. P. und C. FROGER (1995):

Penzym 100 und Penzym 50 durch AFNOR validiert

Dtsch. Milchwirtsch. 46, 1341-1343

MULDOON, M. T., I. A. FONT, R. C. BEIER, C. K. HOLTZAPPLE, C. R. YOUNG und L. H. STANKER (1999):

Development of a cross-reactive monoclonal antibody to sulfonamide antibiotics: evidence for structural conformation-selective hapten recognition

Food Agric. Immunol. 11, 117-134

MUSSER, J. M. B. und K. L. ANDERSON (1999):

Using drug residue screening tests to investigate contamination of milk

Vet. Med. 94, 474-479

NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1981):

Recent advantages of immunochemical methods for analysis of foods

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 919-923

NOUWS, J. F. M., T. B. VREE, R. AERTS und J. GRONDEL (1986):

Pharmacokinetics and residues of sulphadimidine, its N4-acetyl and hydroxy metabolites in food producing animals

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 69-73

NOUWS, J., H. van EGMOND, I. SMULDERS, G. LOEFFEN, J. SCHOUTEN und H. STEGMEMAN (1999):

A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels

Int. Dairy J. 9, 85-90

OKIGBO, O. N. und G. H. RICHARDSON (1985):

Detection of penicillin and streptomycin in milk by impedance microbiology

J. Food Prot. 48, 979-981

OLIVER, S. P., J. L. MAKI and H. H. DOWLEN (1990):

Antibiotic residues in milk following antimicrobial therapy during lactation

J. Food Prot. 53, 693-696

OSTERMEIER, S., E. SCHNEIDER, E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1995):

Rapid enzyme immunoassays for the detection of three sulfonamides in milk

Food Agric. Immunol. 7, 253-258

OTTEN, H., M. PLEMPPEL und W. SIEGENTHALER (1975):

Antibiotika-Fiebel, 4. Auflage, pp. 110-406

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

PAIGE, J. C., L. TOLLEFSON und M. MILLER (1997):

Public health impact on drug residues in animal tissue

Vet. Human Toxicol. 39, 162-169

PEREZ, E. F., G. O. NETO und L. T. KUBOTA (2001):

Bienzymatic amperometric biosensor for oxalate

Sensors and Actuators B 72, 80-85

PEREZ, N., R. GUTIERREZ, M. NOA, G. DIAZ, H. LUNA, I. ESCOBAR und Z. MUNIVE (2002):

Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans and chloramphenicol residues in pasteurized milk

J. AOAC Int. 85, 20-24

PETERS, J. H., G. R. GORDON, E. LIN, C. E. GREEN und C. A. TYSON (1990):
Polymorphic N-acetylation of sulfamethazine and benzidine by human liver: implication for cancer risk?

Anticancer Res. 10, 225-230

PFEIFFER, T., J. TUERK, K. BESTER und M. SPITELLER (2002):

Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry

Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 663-669

PIDDOCK, L. J. V. (1996):

Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?

J. Antimicrob. Chemother. 38, 1-3

PREU, M., D. GUYOT und M. PETZ (1998):

Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions

J. Chromatogr. A 818, 95-108

RAMANATHAN, K., B. JONSSON und B. DANIELSSON (2001):

Sol-gel based thermal biosensor for glucose

Anal. Chimica Acta 427, 1-10

RASOOLY, A. (2001):

Surface plasmon resonance analysis of staphylococcal enterotoxin B in food

J. Food Prot. 64, 37-43

RECK, B. und J. FREVERT (1990):

Competitive- and inhibition-type immunoassay for determination of endosulfan

In: VAN EMON, J. M. und R. O. MUMMA: Immunochemical Methods for Environmental Analysis, ACS Symposium Series No 442, Kap. 16, pp. 193-198

American Chemical Society, Washington DC

RIEDIKER, S. und R. H. STADLER (2001):

Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry

Anal. Chem. 73, 1614-1621

ROHNER, P., M. SCHÄLLIBAUM und J. NICOLET (1985):

Detection of penicillin G and its benzylpenicilloyl (BPO)-derivates in cow milk and serum by means of an ELISA

J. Food Prot. 48, 59-62

SARKAR, P. (1999):

A novel amperometric biosensor for detection of penicillin in milk

J. Indian Chem. Soc. 76, 495-497

SCHÄLLIBAUM, M. (1990):

Antibiotikatherapie und Rückstände in der Ablieferungsmilch

Swiss. Vet. 7, 7-9

SCHIFFMANN, A. P., M. SCHUETZ und H. WIESNER (1992):

False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. 1. The influence of antibiotic residues in bulk milk on lactic acid production of starter cultures

Milchwiss. 47, 712-715

SCHLIEPHAKE, A. (1998):

A comparative study of a newly developed agar-diffusion test and the brilliant-black reduction test in conjunction with an ELISA-reader to measure antibiotic residues in milk

Milchwiss. 53, 88-92

SCHNAPPINGER, P. (1992):

Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Streptomycin

Diss. med. vet. München

SCHNAPPINGER, P., E. SCHNEIDER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1996):

Rapid detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by enzyme-linked immunofiltration assay

Food Agric. Immunol. 8, 269-272

SCHUMACHER, E. (1962):

Chemie, Pharmazie und Pharmakologie der in der Veterinärmedizin gebräuchlichen Antibiotika

Schweiz. Arch. Tierheilk. 104, 350-360

SCHÜTZ, A. J., M. WINKLMAIR, M. G. WELLER und R. NIESSNER (1999):

Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays

Fresenius J. Anal. Chem. 363, 625-631

SCOTT, A. O. (1998):

Biosensors for food analysis: perspectives

In: A. O. SCOTT: Proceedings of the symposium "Biosensors for Food Analysis", 10-12 April 1994, University of Leeds, Special Publication 167, Kap. 19, pp. 1-5

The Royal Society of Chemistry 1998

SETFORD, S. J., R. M. VAN ES, Y. J. BLANKWATER und S. KRÖGER (1999):

Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid β -lactam quantification in milk

Anal. Chim. Acta 398, 13-22

SINGH, P., B. P. RAM und N. SHARKOV (1989):
Enzyme immunoassay for screening of sulfamthazine in swine
J. Agric. Food Chem. 37, 109-114

SØGAARD, H. (1979):
An improved microbiological procedure for detection of streptomycin residues in milk and animal tissues
Acta Vet. Scand. 20, 38-44

SPINKS, C. A., G. M. WYATT, S. EVEREST, R. JACKMAN und M. R. A. MORGAN (2002):
Atypical antibody specificity: advancing the development of a generic assay for sulphonamides using heterologous ELISA
J. Sci. Food Agric. 82, 428-434

STANKER, L. H. und R. C. BEIER (1996):
Introduction to immunoassays for residue analysis
American Chemical Society, Washington DC, 1996
ACS Symposium series 621

STARODUB, N. F., B. B. DZANTIEV, V. M. STARODUB und A. V. ZHERDEV (2000):
Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective-field-effect transistor
Anal. Chimica Acta 424, 37-43

STERNESJÖ, Å., C. MELLGREN und L. BJÖRCK (1995):
Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay
Anal. Biochem. 226, 175-181

STOEV, G. und A. MICHAILOVA (2000):

Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

J. Chromatogr. A 871, 37-42

SUHREN, G. (1996):

Untersuchungen zum Einfluß von Rückständen von antimikrobiell wirksamen Substanzen in Milch auf kommerziell eingesetzte Starterkulturen in Modellversuchen

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 48, 131-149

SUHREN, G. (2002):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch - rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 54, 35-73

SUHREN, G. und K. KNAPPSTEIN (1998):

Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods

Analyst 123, 2797-2801

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998):

Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch - Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest

Dtsch. Molkerei-Ztg. 14, 674-681

SUHREN, G., P. HAMMER und W. HEESCHEN (1994):

Hemmstoffe, Antibiotika und Sulfonamide

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 46, 237-248

SUHREN, G., H. G. WALTE und W. HEESCHEN (1996):
Zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Rückstände in Milch auf der Tankwagenebene
In: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen
Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht pp. 315-322

SUNDLOF, S. F. und J. COOPER (1995):
Human health risks associated with drug residues in animal-derived foods
ACS symposium series 636, 5-17

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1979):
Vorkommen und Bedeutung von Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln
Arch. Lebensmittelhyg. 30, 197-202

TEUBER, M. (2001):
Veterinary use and antibiotic resistance
Curr. Opinion Microbiol. 4, 493-499

TOLLEFSON, L. und M. A. MILLER (2000):
Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact
J. AOAC Int. 83, 245-254

USLEBER, W., S. LITZ und E. MÄRTLBAUER (1998):
Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics
Food Agric. Immunol. 10, 317-324

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 DORPE, C., E. COX und B. GODDEERIS (1996):

Induction of group-specific monoclonal antibodies for penicillins

In: HAAGSMA, N. und A. RUITER: Euroresidue III: conference on residues of veterinary drugs in food, 6-8 May, 1996, pp. 387-391

VERHEIJEN, R., I. K. OSSWALD, R. DIETRICH und W. HAASNOOT (2000):

Development of a one step strip test for the detection of (dihydro)streptomycin residues in milk

Food Agric. Immunol. 12, 31-40

WAKSMAN (1965):

A quarter-century of the antibiotic era

Antimicrob. Agents Chemother. 5, 9-19

WALLACE, B. J., P.-C. TAI und B. D. DAVIS (1973):

Effect of streptomycin on the response of Escherichia coli ribosomes to the dissociation factor

J. Mol. Biol. 75, 391-400

WEINSTEIN, L. und N. J. EHRENKRANZ (1958):

Streptomycin and dihydrostreptomycin

Medical Encyclopedia, New York

WELLER, M. G., A. J. SCHUETZ, M. WINKLMAIR und R. NIESSNER (1999):

Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water

Anal. Chim. Acta 393, 29-41

WICHER, K., R. E. REISMAN und C. E. ARBESMAN (1969):

Allergic reaction to penicillin present in milk

JAMA 208, 143-145

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

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

In: KNAPP, W., K. HOLUBAR und G. WICK: Immunofluorescence and related staining techniques, pp. 215-224

Elsevier, Amsterdam u.a.

WOHLFEIL, S. (1999):

Chiptechnologie für DNA-Diagnostik und Sequenzanalyse

Medgen. 11, 2-3

WONG, J. P., R. E. FULTON und Y. M. SIDDIQUI (1991):

Sensitive avidin-biotin amplified fluorogenic enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies for the identification and quantitation of virus

J. Virol. Methods 34, 13-26

WONG, S. S. (1993):

Chemistry of protein conjugation and cross-linking, Kap. 6, pp. 195-204

CRC Press, Inc., USA

WOODWARD, K. N. (1993):

Maximum residue limits - the impact of UK and EC legislation

Recent Adv. Anim. Nutr. (1993), 165-172

WU, F.-B., S.-Q. HN und Y.-F. HE (2002):

Time-resolved immunofluorometry of serum hTSH with enhanced sensitivity

J. Immunoassay Immunochemistry 23, 191-200

YDAVALLI, R. K., R. S. SINGH und S. K. ANAND (1985):

Diffusion test for the detection of streptomycin residues in milk

J. Dairy Res. 52, 595-597

ZIERHUT, G., W. PIEPERSBERG und A. BÖCK (1979):

Comparative analysis of the effect of aminoglycosides on bacterial protein synthesis in vitro
Eur. J. Biochem. 98, 577-583

ZOMER, E. und T. LIEU (1996):

Performance of a broad spectrum anti-microbial drug inhibition assay (AIM 96) in an inter-laboratory collaborative study in bulk raw milk

Milchwiss. 51, 696-698

Zitierte Gesetze, Verordnungen und amtliche Untersuchungsverfahren

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vom 26. Juni 1990. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft 1990, L 224, 1. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 61/2003 vom 16.01.2003 der Kommission

Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, 1994, L 368, 33

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz **LMBG**) in der Fassung vom 9. September 1997 (BGBl. I, 2296), zuletzt geändert durch Änderungsverordnung vom 8.8.2002 (BGBl I, 3116)

Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz **AMG**) in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung des Arzneimittelgesetzes vom 17.8.2002 (BGBl I, 60)

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (**Milchverordnung**) vom 24. April 1995 (BGBl I, 544), zuletzt geändert durch Änderungs-verordnung vom 28.7.1998 (BGBl I, 1935)

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (**Milch-Güte-Verordnung**) vom 9.7.1980 (BGBl I, 878), zuletzt geändert durch die Änderungsverordnung vom 7.2.1997 (BGBl I, 153)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG:

- Nachweis von Hemmstoffen in Milch - Agar-Diffusionsverfahren (Blättchentest); L01.00-6

- Nachweis von Hemmstoffen in Milch - Agar-Diffusionsverfahren (Brillantschwarz-Reduktions-test); L01.01-5

- Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch - Agar-Diffusionsverfahren mit *Bacillus stearothermophilus* (Brillantschwarz-Reduktionstest); L01.00-11

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 Herrn Dr. R. Dietrich für die hervorragende Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die Sorgfalt bei der Durchsicht der Arbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Margit Straka und Herrn Mostefa Djeflal, sei an dieser Stelle ganz herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche und geduldige Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit gedankt.

Herrn Prof. Dr. E. Usleber möchte ich für die anfängliche Betreuung und weitere Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit ausdrücklich danken.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meinem Bruder von ganzem Herzen für ihre Geduld und Motivation, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Angelika Christine Strasser

Geboren am 20. März 1974 in München

Eltern:

Ursula Strasser, geb. Hirsland

Univ.-Prof. Dr. Helmut Strasser

Schulbildung:

1980-1984 Volksschule Weßling

1984-1987 Gymnasium Gilching

1987-1993 Gymnasium Stift Keppel, Hilchenbach

Studium:

1993-1999 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen

Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen:

19. August 1999

Approbation:

24. November 1999

Berufliche Tätigkeit:

November 1999 Beginn des Promotionsstudiums,

Mai bis November 2000 wissenschaftliche Hilfskraft,

seit November 2000 wissenschaftliche Angestellte am

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der

Tierärztlichen Fakultät der LMU München