

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer

Optimierung und Evaluierung von Enzymimmuntests zum Nachweis  
von Cephalosporin-Antibiotika in Milch

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Anna Caroline Bremus

aus Göttingen

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meiner Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>SCHRIFTTUM.....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Cephalosporin-Antibiotika .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Geschichte .....	3
1.2.	Aufbau .....	4
1.3.	Einteilung und Wirkspektrum .....	7
1.4.	Wirkprinzip .....	10
1.5.	Pharmakokinetik.....	11
1.5.1.	Resorption und Verteilung .....	11
1.5.2.	Metabolisierung.....	12
1.5.3.	Elimination .....	14
1.6.	Nebenwirkungen .....	14
1.7.	Resistenzen.....	15
<b>2.</b>	<b>Arzneimittelrückstände in Milch.....</b>	<b>18</b>
2.1.	Ursachen.....	18
2.1.1.	Sekretorische Kontamination .....	18
2.1.2.	Postsekretorische Kontamination .....	19
2.2.	Risiken und Auswirkungen .....	19
2.2.1.	Gesundheitlicher Aspekt .....	20
2.2.2.	Technologische Aspekte bei der Milchverarbeitung.....	20
2.2.3.	Ökonomischer Aspekt .....	21
2.3.	Rechtlicher Hintergrund .....	21
<b>3.</b>	<b>Nachweisverfahren.....</b>	<b>23</b>
3.1.	Screening-Verfahren .....	24
3.1.1.	Mikrobiologische Hemmstofftests .....	24
3.1.2.	Enzymatische Tests .....	25
3.1.3.	Rezeptortests .....	27
3.1.4.	Immunologische Tests.....	27
3.2.	Bestätigungsverfahren .....	32
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION.....</b>	<b>35</b>

---

<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>1.</b>	<b>Herstellung der Immunreagenzien .....</b>	<b>65</b>
<b>2.</b>	<b>Etablierung von Enzymimmuntests.....</b>	<b>66</b>
2.1.	Sensitivität .....	66
2.2.	Spezifität.....	69
<b>3.</b>	<b>Anwendung der Enzymimmuntests.....</b>	<b>72</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>74</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>75</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>96</b>
<b>1.</b>	<b>Zitierte Gesetze und Verordnungen .....</b>	<b>96</b>
<b>2.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
2.1.	Dissertation.....	99
2.2.	Publikation.....	99
<b>3.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
3.1.	Dissertation.....	100
3.2.	Publikation.....	101
<b>4.</b>	<b>Tabellen .....</b>	<b>102</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>104</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

6-APS	6-Amino-Penicillansäure
7-ACS	7-Amino-Cephalosporansäure
ADI	Acceptable Daily Intake
BRT	Brilliant schwarz-Reduktionstest
BSA	bovines Serumalbumin
DAC	Desacetylcefapirin
DFC	Desfuroylceftiofur
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide
EIA	Enzym-Immunoassay
EMA	European Medicines Agency (europäische Arzneimittelagentur)
GlcOx	Glucose-Oxidase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie/Tandem Massenspektrometrie
MRL	Rückstandshöchstmengende (Maximum Residue Limit)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMTT	<i>N</i> -Methyl-Thiotetrazol
PBP	Penicillin-bindendes Protein
SPR	Surface Plasmon Resonance
TLC	Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography)

## I. EINLEITUNG

In der Prophylaxe und Therapie von (Euter-)Infektionen bei Milchkühen spielen Antibiotika eine wichtige Rolle. Aus wirtschaftlichen Gründen und aus Gründen des Tierschutzes wird auch in Zukunft nicht auf den Einsatz von Antiinfektiva in der Milchproduktion verzichtet werden können, wobei  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu den am häufigsten verwendeten Antibiotika-Gruppen zählen. Zur Therapie subklinischer und klinischer Mastitiden werden vor allem Penicillin G und die  $\beta$ -Lactamase-resistenten Isoxazolyl-Penicilline Oxacillin und Cloxacillin eingesetzt. In den letzten Jahren finden aber auch Wirkstoffe der Untergruppe „Cephalosporine“ wegen ihres breiten Wirkspektrums sowie der kurzen Wartezeiten vermehrt Verwendung. Gegenwärtig sind acht Wirkstoffe aus der Gruppe der Cephalosporine – Cefacetril, Cefalexin, Cefalonium, Cefapirin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom und Ceftiofur – für die Behandlung von Lebensmittel liefernden Tieren zugelassen. Präparate mit den Wirkstoffen Cefacetril bzw. Cefazolin sind allerdings derzeit nicht im Handel.

Rückstände von Antibiotika in der Milch stellen ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher dar. Aufgrund dieser Problematik wurden verschiedene gesetzliche Regelungen getroffen. Die Bezahlung der Anlieferungsmilch durch die Molkereien ist in der Milch-Güteverordnung geregelt. Diese sieht verschiedene Qualitäts-Untersuchungen (u. a. auch Hemmstoff-Tests) vor, um Störfälle bei der Verarbeitung von Milch zu vermeiden. Zum Schutz des Verbrauchers schreibt das europäische Lebensmittelrecht u. a. Wartezeiten nach Medikationen und Grenzwerte für Rückstandsmengen von Therapeutika in tierischen Lebensmitteln, sog. „maximum residue limits“ (MRLs), vor. Zur Überwachung dieser Rechtsgrundlagen wurde eine Vielzahl von qualitativen und quantitativen Nachweisverfahren für Antibiotika-Rückstände in Milch entwickelt.

Für routinemäßig durchgeführte Rückstandsuntersuchungen im Rahmen der Bestimmungen der Milch-Güteverordnung werden ausnahmslos mikrobiologische Hemmstofftests eingesetzt. Diese Screening-Tests erlauben aber nur die qualitative Untersuchung mit dem Ergebnis „Hemmstoff-positiv“ oder „Hemmstoff-negativ“. Bei den Cephalosporinen ist dabei problematisch, dass Wirkstoffe wie Cefalexin oder Cefquinom mit diesen Methoden häufig nicht auf MRL-Niveau und damit falsch-negativ nachgewiesen werden, während im Fall von Cefacetril oder Cefapirin schon Rückstandsmengen weit unterhalb des Grenzwertes in Hemmstoff-positiven Ergebnissen

resultieren. Trotz eines solchen eventuell falsch-positiven Ergebnisses muss diese Milch laut einer aufgrund der sog. „Bowland-Affäre“ im Jahr 2006 (in einem Betrieb in England wurde u. a. aus Hemmstoff-positiver Milch Frischkäse produziert) von der EU-Kommission getroffenen Entscheidung als „nicht sicher“ eingestuft werden, solange der entsprechende Hemmstoff nicht identifiziert und insbesondere im Hinblick auf die Einhaltung des MRL-Werts quantifiziert wurde. Ist dies nicht der Fall, ist die Beseitigung einer Hemmstoff-positiven Milch als tierisches Nebenprodukt der Kategorie 2 in VO (EG) Nr. 1774/2002 vorgeschrieben.

Eine ähnliche Problematik besteht auch beim Einsatz sog. Rezeptorbindungstests, die v. a. in Molkereien als Schnelltests zur Kontrolle der Anlieferungsmilch eingesetzt werden und die speziell beim Nachweis von Ceftiofur oftmals zu falsch-positiven Untersuchungsergebnissen führen. Da bislang die erforderliche Identifizierung und Quantifizierung von Hemmstoffen nur mittels aufwändiger, kostenintensiver und für den Routine-Einsatz in Molkereien nicht geeigneter physikalisch-chemischer Verfahren wie HPLC oder LC-MS/MS möglich ist, fehlen in der Praxis ökonomisch vertretbare Möglichkeiten für die entsprechenden Untersuchungen.

Um die hier bestehende analytische Lücke zu schließen, sind enzymimmunologische Verfahren mit ihrer hohen Sensitivität und Spezifität sowie ihrer schnellen und einfachen Durchführbarkeit besonders geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher immunchemische, auf monoklonalen Antikörpern basierende Verfahren entwickelt werden, die den schnellen substanzspezifischen und quantitativen Nachweis der zurzeit eingesetzten Cephalosporin-Antibiotika – Cefalexin, Cefapirin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom und Ceftiofur – in Milch auf MRL-Niveau ermöglichen.

## II. SCHRIFTTUM

### 1. Cephalosporin-Antibiotika

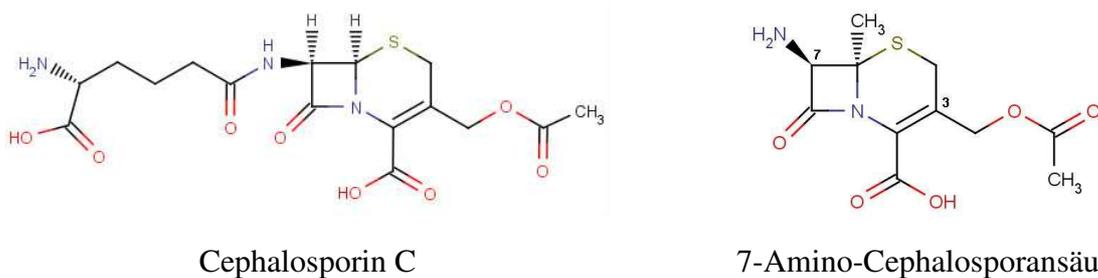
Cephalosporine werden gegenwärtig zunehmend zur Therapie der bovinen Mastitis eingesetzt. Ein „ideales“ intramammär zu verabreichendes Antibiotikum sollte lokal gut verträglich sein, eine niedrige minimale Hemmkonzentration haben und eine hohe Gewebepenetration sowie eine relativ kurze Ausscheidungszeit aufweisen. Cephalosporine vereinen viele dieser Eigenschaften und weisen im Vergleich zu den klassischerweise intramammär verabreichten Antibiotika, den Penicillinen, zusätzlich ein erweitertes Wirkspektrum gegen die wichtigsten Mastitiserreger auf (Hamann und Heeschen, 1995).

#### 1.1. Geschichte

Die Entdeckung der Antibiotika erfolgte zufällig im September 1928, als Alexander Fleming bemerkte, dass ein unabsichtlich auf eine Kulturplatte mit *Staphylococcus aureus* gelangter Schimmelpilz, *Penicillium notatum*, dessen Wachstum hemmte (Reviews: Demain und Elander, 1999; Friedrich, 2006).

Im Gegensatz zu den Penicillinen war die Entdeckung der Cephalosporine kein Zufallsbefund. Im Laufe des Zweiten Weltkriegs wurde die Suche nach von Mikroorganismen produzierten Antibiotika gezielt angeregt (El-Shaboury et al., 2007). Guisepe Brotzu entdeckte 1948, dass Filtrate von *Cephalosporium acremonium* das Wachstum von Typhus- und anderen Krankheitserregern, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *in vitro* hemmten (Friedrich, 2006; Hornish und Kotarski, 2002; Mason und Kietzmann, 1999). In der Kulturflüssigkeit, die zur Arbeitsgruppe Howard Florey nach Oxford geschickt wurde, konnten drei verschiedene Antibiotika gefunden werden (Hamilton-Miller, 2000; Mason und Kietzmann, 1999). Nach Extraktion des Materials mit organischen Lösungsmitteln wurde zuerst eine Substanz, die strukturell anstatt eines  $\beta$ -Lactam-Rings ein Steroid-Grundgerüst aufweist, isoliert und später nach ihrem Gram-positiven Wirkspektrum benannt – das Cephalosporin P. Aus der verbleibenden wässrigen Phase des gleichen Filtrats gelang außerdem noch die Isolierung von Cephalosporin N, benannt nach seinem zusätzlichen Gram-negativen Wirkspektrum, welches sich jedoch später als Penicillin-Derivat erwies. Während eines Versuchs zur Bestimmung des Molekulargewichts von Cephalosporin N entdeckte man 1953 schließlich noch eine dritte Substanz im Filtrat, die folglich Cephalosporin C (Abb. 1) genannt wurde (Bryskier et al., 1994; Demain und Elander, 1999; Hamilton-Miller, 2000;

Schmidt, 1976; Turck, 1982). Die heutigen Cephalosporine sind semisynthetische Antibiotika, die sich ursprünglich vom selbst keine klinisch nutzbare antibakterielle Wirksamkeit besitzenden (Barber et al., 2004) Cephalosporin C ableiten (Hornish und Kotarski, 2002). Aus diesem wurde durch Hydrolyse die 7-Amino-Cephalosporansäure (7-ACS) abgespalten, auf der primär die Entwicklung aller Cephalosporine beruhte (Abb. 1 - Mason und Kietzmann, 1999). Die Markteinführung der ersten Cephalosporine fand erst in den 70er Jahren, also ca. 25 Jahre nach ihrer Entdeckung, statt.

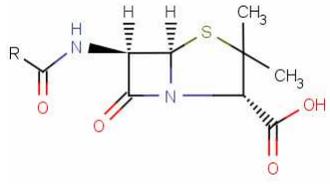
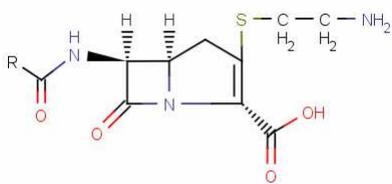
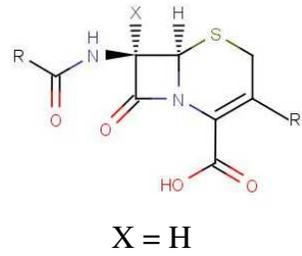
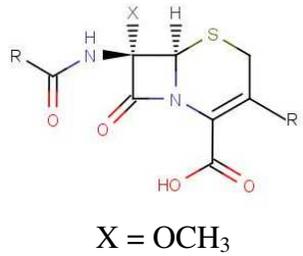
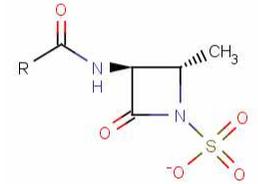


**Abbildung 1:** Strukturformeln von Cephalosporin C und der daraus durch Hydrolyse entstehenden 7-Amino-Cephalosporansäure

## 1.2. Aufbau

Die Cephalosporine gehören neben den Penicillinen, Carbapenemen, Cephamycinen und Monobactamen zur größten Gruppe der antibakteriellen Therapeutika, den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Tab. 1 - Bryskier et al., 1994; Wehling, 2005). Die gemeinsame Grundstruktur dieser Substanzen wird durch den antibakteriell wirkenden  $\beta$ -Lactam-Ring repräsentiert, der das aktive Zentrum von Bakterienzellwand-aufbauenden Enzymen durch Acylierung blockiert (Tomasz, 1986; Waxman und Strominger, 1983). Bei den Cephemen, zu denen sowohl Cephalosporine als auch Cephamycine gehören, ist dieser durch einen sechsgliedrigen Dihydrothiazin-Ring zur 7-ACS ergänzt; bei den Penamen (Penicillinen) durch einen fünfgliedrigen Thiazolidin-Ring zur 6-Amino-Penicillansäure (6-APS). Pename haben also eine 4:5-bizyklische Struktur, während Cepheme eine 4:6-bizyklische Struktur aufweisen (Hornish und Kotarski, 2002; Schmidt, 1976). Durch Substitution von Seitenketten an den C-7- und C-3-Positionen der 7-ACS konnten unterschiedliche Cephalosporine mit verschiedenen Eigenschaften entwickelt werden. Die Zusammensetzung der Seitenketten bedingt z. B. Wirkspektrum, orale Verfügbarkeit, Stabilität bzw.  $\beta$ -Lactamase-Resistenz (Hornish und Kotarski, 2002).

**Tabelle 1:** Übersicht über die verschiedenen Untergruppen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (nach Stahlmann und Lode, 2005)

	<b>Penicilline</b>	<b>Carbapeneme</b>	<b>Cephalosporine</b>	<b>Cephamycine</b>	<b>Monobactame</b>
<b>Struktur</b>					
<b>ursprüngliche Isolierung aus</b>	<i>Penicillium notatum</i>		<i>Cephalosporium acremonium</i>	Streptomyces-Arten	gramnegative Stäbchenbakterien
<b>Seitenketten</b>	1 variable Seitenkette	1 variable Seitenkette	2 variable Seitenketten	2 variable Seitenketten	1 variable Seitenkette
<b>strukturelle Besonderheiten</b>	fünfgliedriger Thiazolidin-Ring	Struktur wie Penicilline, aber C- statt S-Atom („Carba-“) und Doppelbindung im 5er-Ring („-penem“)	sechsgliedriger Dihydrothiazin-Ring	Struktur wie Cephalosporine, aber zusätzlich 7 $\alpha$ -Methoxy-Gruppe	monozyklischer $\beta$ -Lactam-Ring ohne weiteren annelierten Ring

Hierbei bewirken Modifikationen an Position C-7 eher Veränderungen hinsichtlich der antibakteriellen Wirksamkeit wie  $\beta$ -Lactamase-Stabilität und Wirkspektrum; Änderungen an Position C-3 hingegen beeinflussen die metabolische Stabilität und Pharmakokinetik der Verbindungen (Tab. 2 - Christ, 1991; Kalman und Barriere, 1990; Prescott, 2000; Turck, 1982).

**Tabelle 2:** Auswirkungen von Seitenketten-Modifikationen an verschiedenen Cephalosporin-Positionen (Abbildung modifiziert nach Wise, 1990)

antibakterielle Eigenschaften		pharmakologische Eigenschaften
Modifikationen des C-7-Substituenten		Modifikationen des C-3-Substituenten
<ul style="list-style-type: none"> <li>» erhöhte <math>\beta</math>-Lactamase-Stabilität               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Seitenkette mit einem Oxim-Substituenten (-C=N-OH) (z. B. Cefquinom, Ceftiofur)</li> <li>- Aminothiazolyl- und Iminomethoxy-ähnliche Gruppen<sup>3</sup></li> </ul> </li> <li>» erhöhtes Gram-negatives Spektrum               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aminothiazol-Ring (z. B. Ceftiofur, Cefquinom)<sup>4</sup> </li> <li>- quartäre Ammoniumstruktur (z. B. Cefpirom, Cefquinom)<sup>3</sup></li> </ul> </li> <li>» antipseudomonale Aktivität               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Piperazin-Ring (z. B. Cefoperazon)</li> </ul> </li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>» verlängerte Halbwertszeit<sup>2</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>- saure funktionelle Gruppen (acidic functional substituent; z. B. Ceftriaxon)</li> <li>- Modifikation des heterozyklischen C-3-Rests<sup>4</sup></li> </ul> </li> <li>» Biotransformation<sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ester- (z. B. Cefotaxim) oder Carbamoyl-Substituent</li> </ul> </li> </ul>
Quellen: <sup>1</sup> Christ (1991), <sup>2</sup> Chen et al. (2010), <sup>3</sup> Sader und Jones (1993), <sup>4</sup> Bryskier (1997)		

### 1.3. Einteilung und Wirkspektrum

Es existieren verschiedene Ansätze, die Cephalosporine einzuteilen – eine international anerkannte, völlig einheitliche Klassifizierung gibt es jedoch nicht. Einteilungen basierend auf klinisch-therapeutischen Aspekten in parenteral oder oral zu verabreichende Wirkstoffe (Ocallaghan, 1979), chemischer Struktur, Pharmakokinetik (Bryskier et al., 1994),  $\beta$ -Lactamase-Stabilität oder antibakteriellem Spektrum haben sich nicht durchgesetzt. Weit verbreitet ist jedoch die Einteilung in Generationen (Tab. 3 - Mason und Kietzmann, 1999). Neben dem Zeitpunkt der Markteinführung spiegeln sich in dieser Klassifizierung auch das *in vitro* Wirkspektrum sowie gewisse strukturelle Ähnlichkeiten der Wirkstoffe wider (Christ, 1991; El-Shaboury et al., 2007; Hornish und Kotarski, 2002). Generell zeichnen sich Cephalosporine der späteren Generationen dabei durch ein erweitertes Gram-negatives Wirkspektrum auf Kosten der Aktivität gegen Gram-positive Bakterien sowie eine erhöhte  $\beta$ -Lactamase-Stabilität aus (El-Shaboury et al., 2007).

#### Cephalosporine der ersten Generation

Das Wirkspektrum der Cephalosporine der ersten Generation, zu der die meisten in der Tiermedizin zugelassenen Cephalosporine<sup>1</sup> (Cefalexin, Cefalonium, Cefazolin, Cefacetril und Cefapirin) gehören, ist sehr einheitlich. Daher ist ein Antibiogramm, das für den Einsatz eines Wirkstoffs dieser Generation angefertigt wurde, auch bei allen anderen gültig (Plumb, 2008). Sensibel sind außer Enterokokken und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) v. a. Gram-positive Kokken inklusive *Staphylococcus aureus* (Hornish und Kotarski, 2002). Das Wirkspektrum gegen Gram-negative Bakterien ist limitiert und umfasst Pasteurellen, *Actinobacillus*, Clostridien und Salmonellen, während Pseudomonaden und *Proteus* resistent sind (Mason und Kietzmann, 1999).

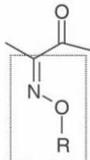
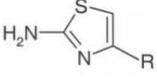
#### Cephalosporine der zweiten Generation

Die enge therapeutische Breite bei Substanzen der ersten Generation führte zur Entwicklung von Cephalosporinen der zweiten Generation (Barber et al., 2004), bei denen das Wirkspektrum aufgrund einer verbesserten  $\beta$ -Lactamase-Stabilität (Fung-Tomc, 1997) auch andere Gram-negative Erreger (Mason und Kietzmann, 1999) wie z. B. *Haemophilus influenzae* (Hornish und Kotarski, 2002; Kalman und Barriere, 1990) umfasst. In der Veterinärmedizin werden sie kaum eingesetzt, zudem ist kein Cephalosporin dieser Generation für die Anwendung beim Lebensmittel liefernden Tier zugelassen.

---

<sup>1</sup> im Folgenden bezieht sich der Begriff „zugelassen“ auf solche Wirkstoffe, die für die Therapie Lebensmittel liefernder Tiere eingesetzt werden dürfen, da für sie ein MRL-Wert festgesetzt wurde

**Tabelle 3:** Einteilung der Cephalosporine in Generationen (zusammengestellt nach Hornish und Kotarski, 2002; Mason und Kietzmann, 1999 sowie Prescott, 2000)

	1. Generation	2. Generation	3. Generation	4. Generation
<b>Entwicklung</b>	1960er Jahre	1970er-Jahre	1980er Jahre	
<b>Wirkspektrum</b>	„Narrow-Spectrum“	„Expanded-Spectrum“	„Broad-Spectrum“	„Extended-Spectrum“
<b>Bezeichnung</b>	„Basis-Cephalosporine“	„Übergangs-Cephalosporine“	„Breitspektrum-Cephalosporine“	
<b>Wirksamkeit</b>	v. a. Gram-positive Kokken	Gram-positive und z. T. Gram-negative ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> ) Keime	geringere Gram-positive Wirksamkeit als 1. Generation, aber erweiterte Gram-negative Wirksamkeit zur 2. Generation	erhöhte Gram-positive und Gram-negative Wirksamkeit im Vergleich zu älteren Generationen
<b>Applikation</b>	v. a. parenteral	oral und parenteral	v. a. parenteral	parenteral und oral
<b>Beispiele</b>	Cefacetril, Cefalexin, Cefalonium, Cefapirin, Cefazolin	Cefaclor	Cefmenoxim, Cefoperazon, Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftiofur, Ceftizoxim, Ceftriaxon	Cefpirom, Cefquinom
<b>strukturelle Eigenschaften</b>			üblicherweise Oxyimino-Gruppe <sup>1)</sup> (fehlt bei Cefoperazon), <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">             1)         </div> <div style="text-align: center;">             2)         </div> <div style="text-align: center;">             3)         </div> </div>	Aminothiazolyl-Methoxyimino-Gruppe an C-7-Position und quartäre Ammonium-Gruppe <sup>3)</sup> an C-3-Position

meist auch Aminothiazolyl-Ring<sup>2)</sup> am Ende der C-7-Seitenkette

### **Cephalosporine der dritten Generation**

Die Cephalosporine der dritten Generation, zu denen auch die veterinärmedizinisch eingesetzten Substanzen Cefoperazon und Ceftiofur gehören, unterscheiden sich stark in ihrem jeweiligen Wirkspektrum. Generell bleibt die Gram-positive Aktivität der Cephalosporine der ersten beiden Generation erhalten, wobei sie im Vergleich zu diesen eine erweiterte, hervorragende Wirksamkeit gegen Gram-negative Erreger (v. a. *Enterobacteriaceae*) besitzen (Plumb, 2008). Außerdem konnte durch strukturelle Veränderungen eine weitere Zunahme der  $\beta$ -Lactamase-Stabilität erreicht werden (Hornish und Kotarski, 2002).

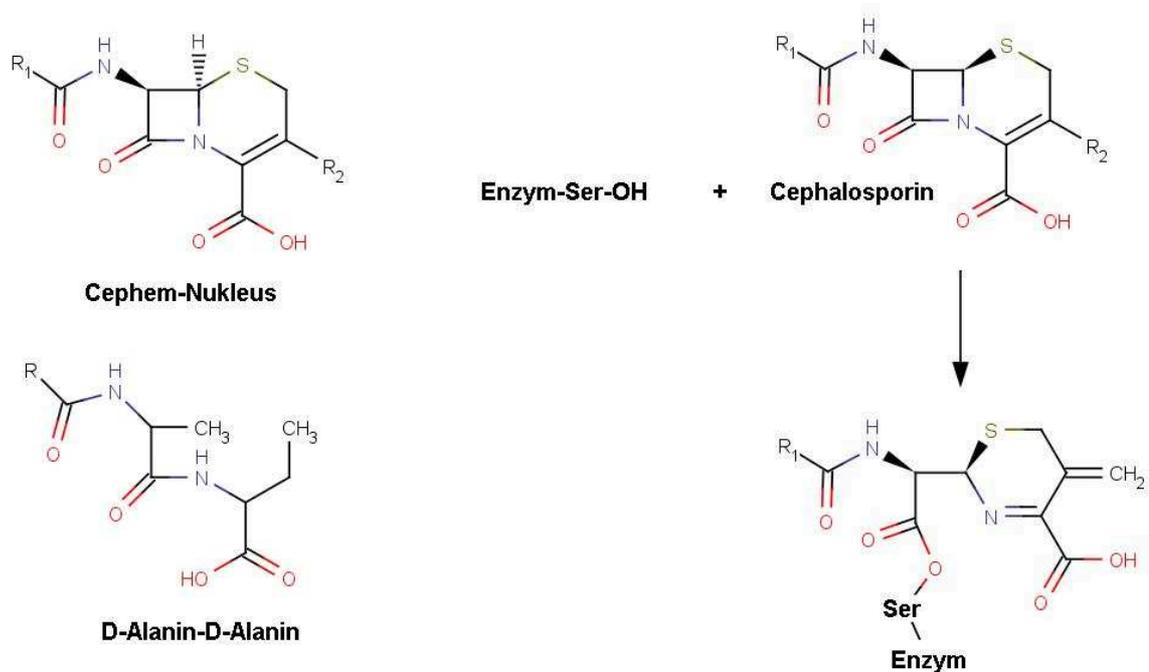
Als gemeinsames strukturelles Merkmal findet sich bei den Vertretern dieser Generation eine Oxyimino-Gruppe (fehlt allerdings bei Cefoperazon) und meist auch ein Aminothiazolyl-Ring am Ende der C-7-Seitenkette (Hornish und Kotarski, 2002). Die linksseitige (C-7) Piperazin-Seitenkette von Cefoperazon ist für dessen antipseudomonale Aktivität verantwortlich (Plumb, 2008).

### **Cephalosporine der vierten Generation**

Zu der neuesten, vierten Generation gehört u. a. das speziell für den Einsatz in der Tiermedizin entwickelte Cefquinom. Wirkstoffe dieser Generation vereinen die Gram-negativen Eigenschaften von Cephalosporinen der dritten Generation mit dem Gram-positiven Wirkspektrum von Substanzen der ersten Generation (Barber et al., 2004). Aufgrund eines erhöhten Membran-Penetrationsvermögens – sie durchdringen als zwitterionische Substanzen wegen ihrer positiven Ladung an der C-3-Seitenkette die negativ geladenen Porine der äußeren Membran Gram-negativer Keime ca. fünf bis zehnmal schneller als Cephalosporine der dritten Generation – ist die Wirksamkeit gegen Gram-negative Bakterien im Vergleich zu Cephalosporinen vorheriger Generationen deutlich erhöht (Fung-Tomc, 1997; Hornish und Kotarski, 2002). Hinzu kommt eine erhöhte  $\beta$ -Lactamase-Stabilität. Hauptindikation sind daher Infektionen mit aeroben Gram-negativen Bakterien (Mason und Kietzmann, 1999). Strukturtypisch sind eine Aminothiazolyl-Methoxyimino-Gruppe an der C-7-Position sowie eine quartäre Ammonium-Gruppe an der C-3-Position (Bryskier, 1997; Fung-Tomc, 1997; Hornish und Kotarski, 2002).

### 1.4. Wirkprinzip

Wie bei allen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beruht die bakterizide Wirkung der Cephalosporine auf einer Störung der bakteriellen Zellwandsynthese (Hornish und Kotarski, 2002; Mason und Kietzmann, 1999), an der vor allem Transpeptidasen beteiligt sind. Diese Vernetzungsenzyme werden aufgrund ihrer Reaktivität mit Penicillinen auch Penicillin-bindende Proteine (PBPs) genannt (Heesemann, 1993; Wilke et al., 2005) und kommen nur in Bakterien, nicht aber in tierischen Geweben, vor (Stahlmann und Lode, 2005). Sie bewirken die Quervernetzung von Glykansträngen über kurze Peptidbrücken im Endstadium der Peptidoglykansynthese. Das hierbei entstehende Murein gewährleistet die Stabilität der Bakterienzellwand (Kroker et al., 2002). Gemäß der Substrat-Analogen-Theorie (Dalhoff, 1979) hemmen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika diese Enzyme irreversibel durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu Peptiden, die mit D-Alanin-D-Alanin enden, dem „physiologischen“ Substrat der Transpeptidasen (Navratilova, 2008; Wilke et al., 2005). Der genaue Hemm-Mechanismus beruht auf der Acylierung der Serin-Hydroxyl-Gruppen der PBPs, wobei der  $\beta$ -Lactam-Ring des Antibiotikums gespalten wird und dieses kovalent an das Enzym bindet (Macheboeuf et al., 2006).



nach Stahlmann und Lode (2005)

nach Lessel (1996)

**Abbildung 2:** Struktureller Vergleich von „physiologischem“ und antibiotisch wirksamem Substrat der PBPs sowie Wirkweise von Cephalosporinen an PBPs

Durch die Verhinderung der Quervernetzung der Mureinstränge in der Zellwand entstehen Deformierungen der Bakterien oder Defekte in der Zellwand; diese wird schließlich instabil (Macheboeuf et al., 2006; Plumb, 2008).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist durch deren unterschiedlichen Zellwandaufbau bedingt (s. Abb. 4): Gram-positive Bakterien besitzen nur eine dicke, für kleine Moleküle wie Cephalosporine aber relativ einfach durch Diffusion zu durchdringende Mureinschicht. Bei Gram-negativen Bakterien ist dieser Schritt erschwert, da sie eine zusätzliche äußere Membran besitzen. Diese besitzt negativ geladene Porine, die nur den Durchtritt positiv geladener Substanzen in den periplasmatischen Raum ermöglichen. Außerdem besitzen Gram-positive Bakterien relativ gesehen weit mehr PBPs als Gram-negative (Prescott, 2000).

Im Gegensatz zu den Aminoglykosiden beispielsweise, die durch Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese auch in der Ruhephase der Bakterien wirksam sind, wirken  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nur in der Vermehrungsphase bakterizid (Beck et al., 1999).

## **1.5. Pharmakokinetik**

Die pharmakologischen Eigenschaften der jeweiligen Cephalosporine sind sehr variabel, gemeinsam ist ihnen in der Regel jedoch die meist parenterale Verabreichungsform, eine extrazelluläre Verteilung, eine kurze Halbwertszeit von ein bis zwei Stunden sowie die Ausscheidung über die Nieren (Christ, 1991; Kroker et al., 2002; Prescott, 2000).

### **1.5.1. Resorption und Verteilung**

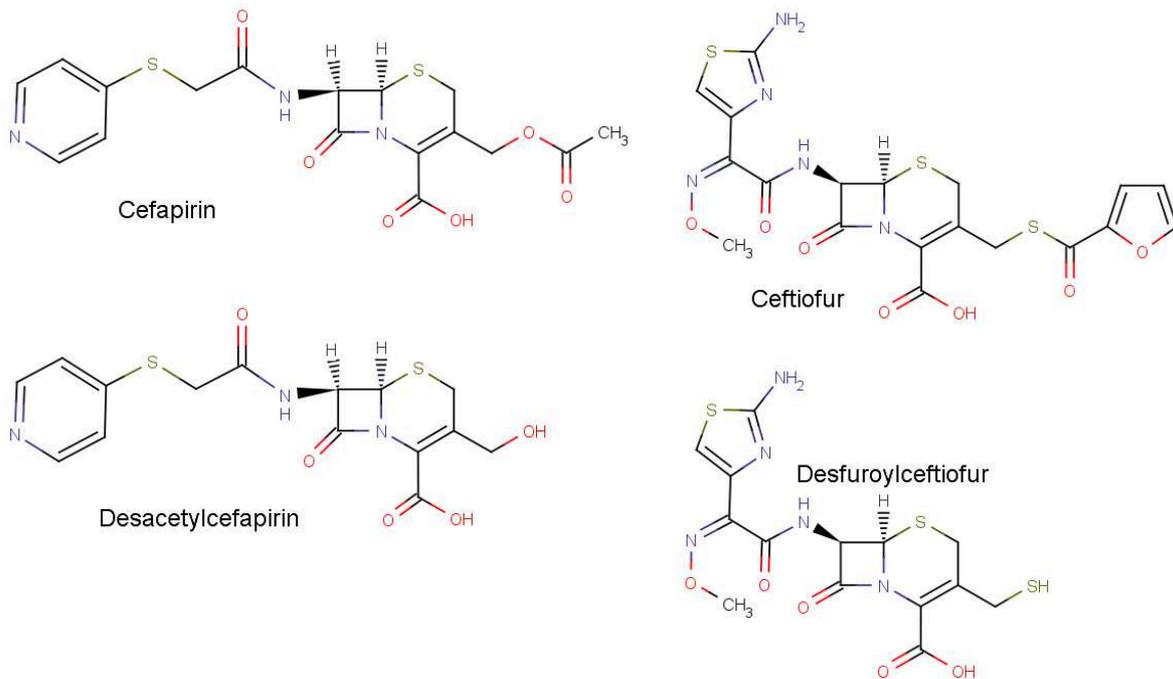
Generell sind  $\beta$ -Lactam-Antibiotika für eine orale Gabe nicht gut geeignet. Der Hauptgrund hierfür liegt in der Inaktivierung der Wirkstoffe durch die im Magen herrschenden niedrigen pH-Werte. Es existieren zwar Cephalosporine, die auch bei niedrigem pH-Wert stabil sind, jedoch weisen diese nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit auf. Daher sind für die orale Anwendung nur wenige Substanzen, wie z. B. Cefalexin oder Cefaclor, geeignet (Mason und Kietzmann, 1999). Zum anderen sind Cephalosporine oftmals sehr hydrophil und somit nicht in der Lage, die Schleimhaut im Dünndarm zu überwinden. Durch sog. „Pro-Drug-Konzepte“ kann die ungenügende Absorption umgangen werden: lipophile veresterte Derivate haben eine höhere Bioverfügbarkeit; die Ester werden nach Resorption durch unspezifische Esterasen gespalten und der aktive Wirkstoff in der Blutbahn freigesetzt (Sörgel et al., 2006). Trotzdem werden die meisten Cephalosporine parenteral verabreicht.

Die labile, reversible Plasmaproteinbindung (Mason und Kietzmann, 1999) ist unterschiedlich hoch (Christ, 1991) und beträgt zwischen 20 und 85 %. Von den zugelassenen Cephalosporinen weist Cefazolin hierbei die stärkste, Cefalexin und Cefacetril die schwächste Bindung auf. Proteingebundene Cephalosporine sind antimikrobiell inaktiv (Meyer-Brunot et al., 1976) und stellen ein die Halbwertszeit verlängerndes, temporäres Reservoir dar. Der freie, aktive Anteil im Blut korreliert mit der Konzentration in den Geweben, wo eine rasche Verteilung im Extrazellularraum stattfindet (Kroger et al., 2002). Dass Cephalosporine nicht in den Intrazellularraum gelangen können, liegt an ihrer schlechten Lipidlöslichkeit und ihrer hohen Polarität. Diese Eigenschaften ermöglichen ihnen zwar, die bakterielle Zellwand gut zu durchdringen, machen dies aber aufgrund der unterschiedlichen Zellwandstruktur bei tierischen Zellen unmöglich.

Im Gegensatz zur Blut-Hirn-Schranke, die von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kaum überwunden wird (Kroger et al., 2002), ist die Penetration der Blut-Milch-Schranke möglich (Kalman und Barriere, 1990). Cephalosporine sind zudem plazentagängig (Kalman und Barriere, 1990; Mason und Kietzmann, 1999), weisen jedoch kein teratogenes Potential auf (Plumb, 2008).

### **1.5.2. Metabolisierung**

In der Regel werden Cephalosporine nur wenig bis gar nicht metabolisiert und unverändert über die Nieren ausgeschieden (Marshall und Blair, 1999; Mason und Kietzmann, 1999). Einige parenteral angewandte Cephalosporine wie z. B. die an der C-3-Position veresterten Cephalosporine der ersten Generation (Cefacetril, Cefapirin bzw. Cephalothin) werden jedoch in der Leber und z. T. auch anderen Organen wie Lunge oder Niere durch spezifische Esterasen deacetyliert (Jones, 1987). Es resultieren Metaboliten, die weniger wirksam sind; jedoch zeigt die deacetylierte Form oft eine synergistische Wirkung zusammen mit der Muttersubstanz, wodurch sich deren Stabilität gegen  $\beta$ -Lactamasen, die Gewebepenetration sowie die Halbwertszeit vermutlich erhöht (Jones und Packer, 1984). Daher wurde in der VO (EU) Nr. 37/2010 als Rückstandshöchstmenge (MRL-Wert) in Zielgeweben als Markerrückstand die „Summe von Cefapirin und Desacetylcefapirin“ (DAC, Abb. 3) festgelegt.



**Abbildung 3:** Strukturformeln von Cefapirin und Cefuroxime sowie deren antimikrobiell wirksamen Haupt-Metaboliten

Cefuroxime wird hauptsächlich in den Nieren und z. T. auch in der Leber durch Esterasen hydrolysiert (Olson et al., 1998). Dabei erfolgt durch die Spaltung der Thioester-Bindung des Cephalosporins die Freisetzung von aktivem Desfuroylcefuroxime (DFC) und Furoesäure (Plumb, 2008). Die Halbwertszeit der Muttersubstanz beträgt dadurch weniger als zehn Minuten (Hornish und Kotarski, 2002). Durch oxidative Konjugation können mit dem Sulfhydryl-Rest des DFC verschiedene Konjugate gebildet werden: durch Bindung an Glutathion entsteht DFC-Glutathion, durch Bindung an Cystein oder aus DFC-Glutathion (Olson et al., 1998) wird DFC-Cystein gebildet. Auch die Konjugation zu einem DFC-Dimer über Disulfid-Brücken ist möglich. All diese Konjugate besitzen den intakten  $\beta$ -Lactam-Ring und können unter den entsprechenden Bedingungen auch wieder zu DFC reduziert werden. Die Sulfhydryl-Gruppe ist ebenfalls verantwortlich für die reversible kovalente Bindung von DFC über Disulfid- oder Thioester-Bindungen an Plasma- und Gewebe-Proteine, wodurch die Halbwertszeit verlängert wird. Letztlich wird DFC durch Hydrolyse des  $\beta$ -Lactam-Rings weiter metabolisiert. Hierbei geht die antimikrobielle Wirkung schließlich verloren (Hornish und Kotarski, 2002).

Da so viele unterschiedliche Abbauprodukte beim Cefuroxime-Stoffwechsel entstehen, wurde als MRL-Wert in Verordnung (EU) Nr. 37/2010 für diesen Wirkstoff die „Summe aller den  $\beta$ -Lactam-Ring enthaltenden und als DFC gemessenen Rückstände“ als Markerrückstand festgelegt.

### 1.5.3. Elimination

Bei den anderen Cephalosporinen findet hingegen keine nennenswerte Metabolisierung statt, d. h. sie werden unverändert wieder ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei ca. ein bis zwei Stunden; eine Ausnahme bildet Ceftriaxon mit einer Halbwertszeit von ca. acht Stunden (Christ, 1991; Marshall und Blair, 1999). In der Regel erfolgt die Elimination renal, v. a. über glomeruläre Filtration, aber auch über tubuläre Sekretion (Christ, 1991; Mason und Kietzmann, 1999). Eine Besonderheit besteht bei der Ausscheidung der Cephalosporine Cefoperazon und Ceftriaxon, die bei diesen beiden Wirkstoffen hauptsächlich biliär geschieht (Christ, 1991; Kalman und Barriere, 1990; Mason und Kietzmann, 1999; Plumb, 2008). Da kaum eine Rückresorption aus dem Darm stattfindet, treten sie nicht in den enterohepatischen Kreislauf ein, was zu hohen intrainestinalen Konzentrationen führt. Hierdurch wird die physiologische Darmflora besonders beeinträchtigt, wodurch auch mögliche Resistenzen gefördert werden.

### 1.6. Nebenwirkungen

$\beta$ -Lactam-Antibiotika besitzen eine große therapeutische Breite (Stahlmann und Lode, 2005), daher wird ihnen generell eine sehr gute Verträglichkeit zugesprochen (Kroker, 2006). Nebenwirkungen kommen relativ selten vor und sind üblicherweise nur milde (Kalman und Barriere, 1990; Plumb, 2008).

Zu den bekanntesten – und gefürchtetsten – Nebenwirkungen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehören Allergien und Hypersensitivitätsreaktionen, die nur entstehen können, wenn das als Hapten wirkende  $\beta$ -Lactam-Molekül durch Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Rings an endogene Proteine bindet und so ein immunogenes Konjugat bildet (Kersten und Brade, 1979; Mason und Kietzmann, 1999). Für Penicilline ist dieser Mechanismus bekannt: die Penicilloyl-Gruppe wird hierbei als Hauptdeterminate angesehen (Kersten und Brade, 1979).

Bei Cephalosporinen hingegen konnten die Allergie-induzierenden Hapten-Protein-Verbindungen bisher nicht eindeutig identifiziert werden (Kelkar und Li, 2001; Madaan und Li, 2004; Sendzik und Stahlmann, 2006). Es wurde jedoch beschrieben, dass Cephalosporine analog zu den Penicillinen durch eine Cephalosporoyl-Gruppe an Proteine binden (Miranda et al., 1996; Sendzik und Stahlmann, 2006). Kreuzreaktionen zwischen Penicillinen und Cephalosporinen sind v. a. für Wirkstoffe der dritten Generation selten (Kroker, 2006), treten jedoch immer wieder gerade zwischen strukturanalogen Substanzen wie z. B. Cefalexin und Ampicillin auf, die identische C-7-Seitenketten aufweisen.

Grundsätzlich können sowohl die Sensibilisierung als auch die Auslösung von bereits vorhandenen Antibiotika-Allergien durch eine „kaschierte Exposition“, wie es z. B. beim Vorhandensein von Antibiotika-Rückständen in Nahrungsmitteln der Fall ist, ausgelöst werden (Kersten und Brade, 1979). Allerdings wird die Gefahr, eine Sensibilisierung durch Hapten-Aufnahme auf diesem Weg auszulösen, als sehr gering eingestuft (Allison, 1985). Zudem ist eine Sensibilisierung bei oralem Aufnahmeweg selbst bei Einsatz therapeutischer Dosierungen von Cephalosporinen sehr viel seltener als bei einer parenteralen Verabreichung. Bei bereits sensibilisierten Personen werden jedoch immer wieder nahrungsassoziierte Fälle allergischer Reaktionen beschrieben (Dewdney et al., 1991).

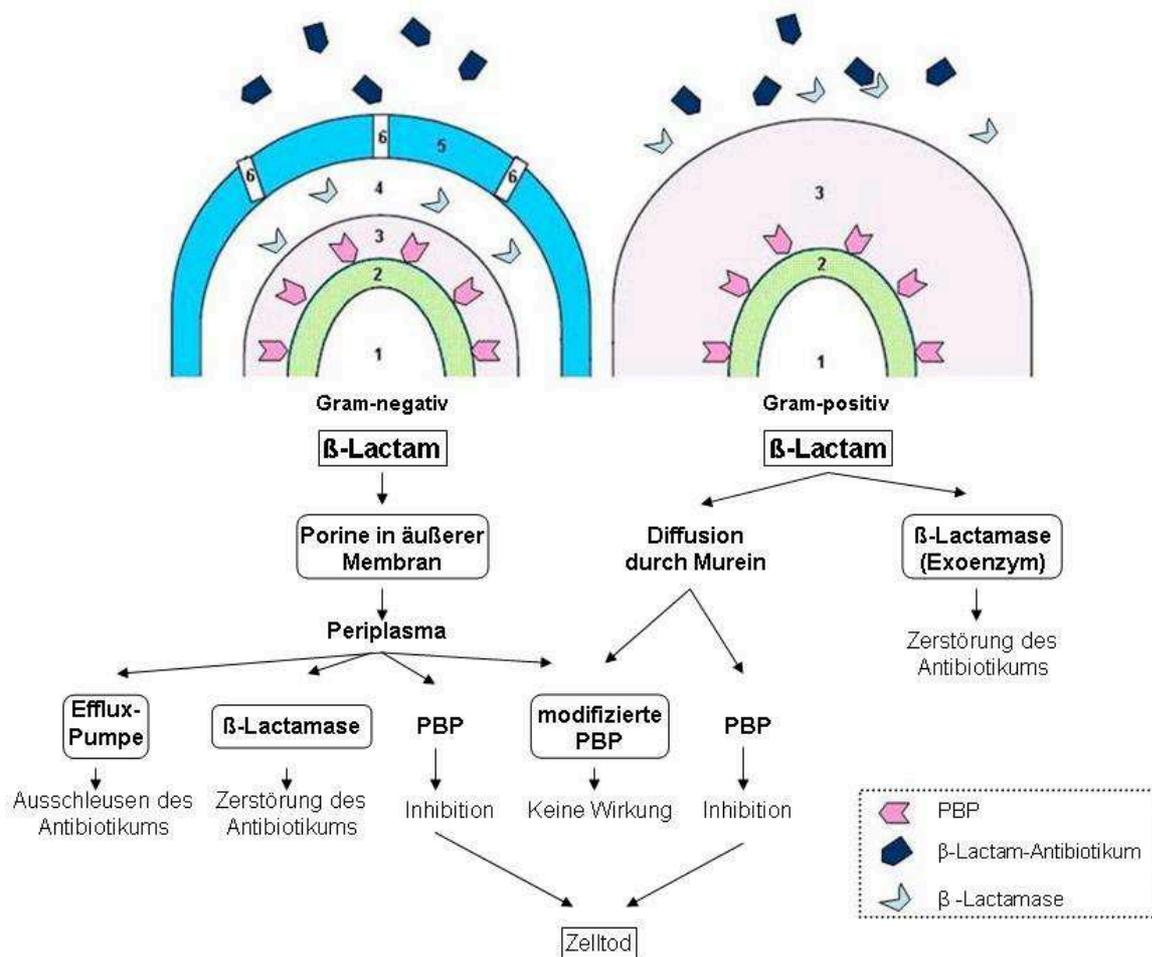
Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen, hervorgerufen durch Veränderungen der körpereigenen gastrointestinalen Flora (Christ, 1991; Kalman und Barriere, 1990; Plumb, 2008), sind antibiotikaassoziierte Durchfälle (Sendzik und Stahlmann, 2006). Bei Cephalosporinen, die einen N-Methyl-Thiotetrazol-Ring (NMTT; z. B. Cefoperazon oder Cefmenoxim) aufweisen, ist bekannt, dass diese Seitenkette durch Interaktionen im Vitamin-K-Stoffwechsel zu Störungen der Blutgerinnung führt (Kalman und Barriere, 1990; Welage et al., 1990). Im Gegensatz zu den Penicillinen besteht bei Cephalosporinen auch ein nephrotoxisches Potential, vor allem bei Wirkstoffen der älteren Generationen wie Cefaclor oder Cefazolin (Keller und Geberth, 2007).

### 1.7. Resistenzen

Wenn die Konzentration eines Antibiotikums am Infektionsort nicht ausreicht, um die Vermehrung eines bakteriellen Infektionserregers zu hemmen oder ihn abzutöten, gilt dieser als resistent (Witte und Klar, 1999). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Resistenz-Typen. Auf der einen Seite gibt es natürliche Resistenzen, bei denen alle Stämme einer Bakterienspezies *per se*, also auch ohne das Vorliegen von Erbgutveränderungen, gegen eine Substanz resistent sind, da z. B. der „Angriffsort“ fehlt (Kroker, 2006; Wehling, 2005). Bei  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist dies beispielsweise bei zellwandlosen Bakterien (Mykoplasmen, Chlamydien) der Fall (Normark und Normark, 2002). Auf der anderen Seite stehen die erworbenen Resistenzen, bei denen spezifische Resistenzmechanismen über Resistenzgene exprimiert werden (chromosomal determinierte Resistenz). Erworbene Resistenzen können durch Mutationen des Erbguts entstehen, aber auch durch Übertragung von Resistenzgenen auf andere Bakterien. Erworbene Resistenzmechanismen beruhen auf verschiedenen, im Folgenden beschriebenen (Abb. 4), Resistenzmechanismen (Helmuth, 1999; Lessel, 1996) und führen immer zur Selektion

bakterieller Mutanten aus zuvor empfindlichen Populationen (Kroger, 2006).

Resistenzen von Erregern gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beruhen meist auf deren Fähigkeit, die Wirkstoffe zu einem für sie unschädlichen Metaboliten umzuwandeln (Feuerpfeil et al., 1999). Vor allem Gram-negative Bakterien (Neu, 1982; Sader und Jones, 1993; Wilke et al., 2005) produzieren zu diesem Zweck als sog.  $\beta$ -Lactamasen bezeichnete Enzyme, die reversibel an das Antibiotikum binden, dessen  $\beta$ -Lactam-Ring hydrolytisch spalten (Mason und Kietzmann, 1999) und so zum Wirkverlust führen, bevor es an die PBPs binden kann (Wilke et al., 2005).



1) Zytoplasma; 2) innere Membran; 3) Mureingerüst (Peptidoglykanschicht); 4) periplasmatischer Raum;  
5) äußere Membran; 6) Porine

**Abbildung 4:** Resistenzmechanismen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien im Vergleich (modifiziert nach Lessel, 1996)

$\beta$ -Lactamasen sind bei Gram-positiven Bakterien meist Exoenzyme, während sie sich bei Gram-negativen Bakterien vorzugsweise zellgebunden im periplasmatischen Raum befinden (Abb. 4 - Theuretzbacher, 1998). Daher gibt es bei Gram-positiven Bakterien nur „Entweder-oder-Urteile“ bezüglich der Sensibilität, während bei Gram-negativen noch andere Faktoren Einfluss nehmen und zur Eigenschaft „mäßig sensibel“ führen können (Stahlmann und Lode, 2005). Man unterscheidet je nach Substratspezifität weiter zwischen Penicillinasen (z. B. von Staphylokokken gebildet) und Cephalosporinasen (Bildung z. B. von Pseudomonaden). Die Empfindlichkeit von Cephalosporinen gegenüber diesen  $\beta$ -Lactamasen ist sehr unterschiedlich, nicht nur zwischen sondern auch innerhalb der verschiedenen Generationen (Mason und Kietzmann, 1999). Im Allgemeinen sind Cephalosporine der neueren Generationen resistenter gegen  $\beta$ -Lactamasen als die der älteren Generationen.

Weitere Resistenzstrategien bestehen in der Verhinderung der Aufnahme von Antibiotika in die bakterielle Zelle (Feuerpfeil et al., 1999) durch eine erniedrigte Permeabilität der Zellwand. Dieses Phänomen wird aufgrund der Zellwandstruktur nur bei Gram-negativen Bakterien beobachtet. Diese besitzen in ihrer äußeren Membran negativ geladene Porine, die normalerweise Moleküle bis zu 600 Dalton und somit auch Cephalosporine mit positiver Ladung leicht passieren lassen (Kroker, 2006; Sader und Jones, 1993). Durch „Abschalten“ dieser weitulmigen Porine und Verschiebung des Porinmusters hin zu engerlumigen Poren können Antibiotika die äußere Membran nicht mehr passieren, es kommt zur (Multi)Resistenz. Dieser Mechanismus wurde z. B. für *Salmonella* Typhimurium beschrieben (Medeiros et al., 1987).

Ein anderer Resistenzmechanismus beruht auf Modifikationen der PBPs (Feuerpfeil et al., 1999). Das bekannteste Beispiel hierfür sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), bei denen durch das sog. *mecA*-Gen anstatt des normalen PBP das sog. PBP2 synthetisiert wird, das eine verringerte Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aufweist (Kalman und Barriere, 1990; Lessel, 1996).

Schließlich gibt es noch den Mechanismus der aktiven Ausschleusung über Efflux-Pumpen, der zwar hauptsächlich bei Resistenzen gegen Tetrazykline zum Tragen kommt (Nikaido, 1998; Nikaido, 2009), der aber auch für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beschrieben wurde (Wilke et al., 2005)

## **2. Arzneimittelrückstände in Milch**

Antibiotika-Rückstände in Milch können nicht nur gegen gesetzliche Regelungen verstoßen, sondern auch gegen das vom modernen und aufgeklärten Konsumenten in zunehmendem Maß geforderte Reinheitsprinzip (Schällibaum, 1990). Hierbei nimmt Milch im Vergleich mit anderen Produkten aus Sicht des Verbrauchers eine besondere Rolle ein, da sie als außergewöhnlich gesundes und naturbelassenes Lebensmittel gilt und zudem eine wichtige Komponente in der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern darstellt (Baumgartner et al., 2010; Katz und Brady, 1993).

### **2.1. Ursachen**

Die Ursachen, die zu Rückständen in Milch führen, sind vielfältig. Als Hauptgrund sind Management-Fehler nach intramammärer Therapie von Kühen mit (sub-)klinischer Mastitis anzusehen (Knappstein et al., 2004), jedoch gibt es auch viele andere Wege, auf denen Milch mit Hemmstoffen kontaminiert werden kann. Grundsätzlich unterscheidet man hierbei die sekretorische von der postsekretorischen Kontamination der Milch (Tab. 4).

#### **2.1.1. Sekretorische Kontamination**

Sekretorische Kontamination bedeutet, dass Hemmstoffe über den Stoffwechsel des Tieres in die Milch gelangen. Sie ist u. a. abhängig von der Resorption, Fettlöslichkeit und Persistenz in den verschiedenen Organsystemen (Töpel, 2004). Die häufigste Ursache ist, dass nach antibakterieller Therapie unabsichtlich die Wartezeit nicht eingehalten wurde: so werden behandelte Kühe z. B. nicht richtig gekennzeichnet oder es kommt zu Verwechslungen – falsche Kuh behandelt, falsches Medikament verwendet, falsches Datum eingetragen, etc. (Baumgartner, 2008). Bei nicht sach- oder bestimmungsgemäßer Anwendung von Arzneimitteln kann es ebenfalls zu einer Kontamination kommen, denn Wartezeiten gelten immer nur für die jeweilige zugelassene Anwendungsart, Dosierung und angegebene Indikation. So gilt die Wartezeit von null Tagen für Ceftiofur z. B. nur bei intramuskulärer oder subkutaner Injektion des Wirkstoffs, nicht aber bei intramammärer Anwendung.

In selteneren Fällen ist die Ausscheidungsrate einzelner Antibiotika bei erkrankten Kühen außergewöhnlich hoch. Auch die Fütterung von Antibiotika-haltigem Futter führt zu Rückständen in Milch (Töpel, 2004).

**Tabelle 4:** Ursachen für das Entstehen von Antibiotika-Rückständen (zusammengestellt nach Jones und Seymour, 1988; Schällibaum, 1990 sowie Booth, 1982)

Sekretorische Kontamination	Postsekretorische Kontamination
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melken von behandelten Kühen innerhalb der Wartezeit               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ keine/ungenügende Kennzeichnung der behandelten Tiere</li> <li>○ mangelhafte Aufzeichnungen über Behandlungen</li> <li>○ Wartezeit nur bei Milch der behandelten Euterviertel eingehalten</li> <li>○ trockengestellte Kuh gemolken</li> </ul> </li> <li>• Unsachgemäße Anwendung/ Überdosierung von zugelassenen Medikamenten</li> <li>• Verzögerte Ausscheidung mit der Milch durch pathologisch verändertes Euterviertel</li> <li>• Zu kurze Trockenstehphase/Früh-Kalben</li> <li>• Ankauf behandelter Kühe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verschleppung durch kontaminiertes Melkgeschirr               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ falsche Melkreihenfolge</li> <li>○ ungenügende Zwischenreinigung/ -desinfektion</li> </ul> </li> <li>• Verschleppung durch Melkpersonal (Hände)</li> <li>• versehentlicher Transfer in den Sammel-tank</li> </ul>

### 2.1.2. Postsekretorische Kontamination

In über 50 % der Fälle erfolgt die Kontamination der Tankmilch erst nach dem Melken. Ursächlich für diese „Verschleppungskontamination“ sind eine falsche Melkreihenfolge (behandelte Tiere nicht zuletzt gemolken), Verschleppungen von Antibiotika über die Hände des Melkpersonals oder Melkgeschirre und nicht ausreichend gereinigte Leitungen oder verunreinigte Oberflächen. Letzteres sind jedoch vergleichsweise schwer aufzuklärende Ursachen von Hemmstoff-positiven Ergebnissen (Baumgartner, 2008; Schällibaum, 1990).

### 2.2. Risiken und Auswirkungen

Prinzipiell kann man die Auswirkungen von rückstandsbelasteter Milch in drei Übergruppierungen einteilen: (1) potentielle Gesundheitsgefährdung des Verbrauches, (2) technologische Aspekte bei der Milchverarbeitung und (3) ökonomische Verluste (Töpel, 2004).

### **2.2.1. Gesundheitlicher Aspekt**

Durch die Aufnahme von Antibiotika-Rückständen in tierischen Lebensmitteln können verschiedene gesundheitliche Probleme auftreten. Somogyi (1989) teilt diese in pharmakologisch-toxische, mikrobiologische und immunpathologische Risiken ein. Bei Cephalosporinen, die (wie Cefoperazon) eine NMTT-Seitenkette besitzen, wurden beim Menschen humorale Blutgerinnungsstörungen und Alkoholunverträglichkeitsreaktionen beschrieben (Christ, 1991). Ein weiterer negativer Effekt ist die Beeinflussung der natürlichen Darmflora des Menschen, durch deren Zerstörung es zu sog. Dysbiosen und dadurch zu antibiotikaresponsiven Durchfällen kommt. Besondere Gefahr geht dabei von der Begünstigung der Bildung antibiotikaresistenter pathogener Bakterienstämme in der Darmflora aus (Booth, 1982; Töpel, 2004). Im Zusammenhang mit Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft gilt die Induzierung bzw. Auslösung von Allergien als besonders problematisch (Booth, 1982). Dass Rückstände selbst als Allergiensensibilisierendes Allergen wirken, ist durch die im Vergleich zur therapeutischen Dosis sehr kleinen Mengen und den oralen Expositionsweg sehr unwahrscheinlich (Dayan, 1993). Bei Penicillin-empfindlichen Personen wird jedoch auch schon bei geringen Konzentrationen die Auslösung einer allergischen Reaktion befürchtet (Großklaus, 1989), die häufig zu Hautreaktionen, in selteneren Fällen auch zum anaphylaktischen Schock führen kann.

### **2.2.2. Technologische Aspekte bei der Milchverarbeitung**

Bis in die 60er Jahre wurde im Zusammenhang mit Antibiotika-Rückständen in Milch dem Aspekt der technologischen Beeinflussung bei der Milchverarbeitung die größte Bedeutung beigemessen (Mitchell et al., 1998). Hemmstoffe, zu denen neben Antibiotika auch originäre Milchinhaltsstoffe, Reinigungs- und Desinfektionsmittel oder Futtermittelinhaltsstoffe gehören, behindern das Wachstum von in der Milchindustrie eingesetzten Säuerungs- und Starterkulturen und führen so zu schwerwiegenden Qualitätsfehlern bei Milchprodukten. Säuerungsstörungen entstehen vor allem wegen der hohen Empfindlichkeit der Milchsäurebakterien gegenüber Antibiotika. So ist die Empfindlichkeit von Laktobazillen gegenüber Penicillin z. B. um ein bis zwei Zehnerpotenzen größer als die der zu bekämpfenden Mastitiserreger (Töpel, 2004). Diesem Aspekt wurde z. T. auch bei der Festlegung der MRL-Werte für Cephalosporine Rechnung getragen. So wurde z. B. bei der Festlegung des MRL-Werts für Cefoperazon v. a. dessen technologische Störgrenze berücksichtigt, obwohl die – auf der Wirkung auf die Darmflora beruhende – tolerierbare Tagesdosis (acceptable daily intake, ADI) laut Risikobewertung

der europäischen Arzneimittelagentur EMA (European Medicines Agency) deutlich höhere Werte erlaubt hätte (EMA, 2000).

### **2.2.3. Ökonomischer Aspekt**

Nicht nur Abzüge beim Milchpreis gemäß Milch-Güteverordnung treffen den Landwirt schwer. Teilweise werden auch Vertragsstrafen in gleicher Höhe fällig. Ist eine Rückverfolgung möglich, können auch Schadensersatzansprüche der Milchverarbeitenden Betriebe wegen Fehlproduktionen und Qualitätsbeeinträchtigungen geltend gemacht werden. Außerdem müssen die Kosten für die Entsorgung des Hemmstoff-positiven Sammel tanks sowie der Warenwert der verlorenen Milch erstattet werden.

### **2.3. Rechtlicher Hintergrund**

Die Rückstandsfreiheit von Milch wird schon seit langem gefordert, wobei ursprünglich die Produktionssicherheit für fermentierte Produkte wie Käse oder Joghurt im Vordergrund stand. Zu diesem Zweck schreibt die Milch-Güteverordnung monatlich mindestens zwei Untersuchungen zur Feststellung von Hemmstoffen vor und regelt so die Qualitätsbezahlung der Anlieferungsmilch durch die Molkereien: bei einem positiven Befund erfolgt ein Preisabzug um fünf Cent/kg je positives Untersuchungsergebnis des jeweiligen Monats. Eine Verifizierung oder Identifizierung Hemmstoff-positiver Proben ist gemäß dieser Verordnung nicht vorgesehen.

Auch schon im LMBG (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) in der Fassung von 1974, also seit über 35 Jahren, wird aus Gründen des Verbraucherschutzes die weitgehende Rückstandsfreiheit von Lebensmitteln gefordert. Da eine absolute Rückstandsfreiheit unter Berücksichtigung der Möglichkeiten der modernen Rückstandsanalytik bei behandelten Tieren kaum erreicht werden kann, muss bei der Beurteilung zwischen „akzeptablen“ und „nicht akzeptablen“ Rückständen unterscheiden werden. Daher wurden 1990 in der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 sog. MRL-Werte definiert (Heeschen, 2010). Nach über 20 Jahren wurde diese Verordnung 2009 durch die „EU-Rückstandshöchstmengen-Verordnung“ VO (EG) Nr. 470/2009 ersetzt, die seit Februar 2010 durch die Verordnung (EU) Nr. 37/2010 ergänzt wird. In dieser sind alle MRL-Werte aus den Anhängen der ehemaligen VO 2377/90 beibehalten, jedoch in neuer Sortierung aufgeführt. Man unterscheidet nun „zulässige Stoffe“ von „verbotenen Stoffen“ (Frerichs, 2011). Diese Regelungen werden auch im LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch), § 10, aufgegriffen. Demnach ist es verboten, tierische Lebensmittel in den Verkehr zu bringen, wenn Tierarzneimittel mit Anwendungsverbot eingesetzt wurden, Höchstmengen

überschritten wurden oder festgelegte Wartezeiten nicht eingehalten wurden.

Im „EU-Hygienepaket“ von 2004, das seit 1. Januar 2006 in Kraft ist, werden u. a. die gesetzlichen Verpflichtungen der Milcherzeuger geregelt: in VO (EG) Nr. 853/2004, Anhang III, Abschnitt IX wurde festgelegt, dass Tiere, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, nur mit zugelassenen Stoffen behandelt worden sein dürfen, dass bei zugelassenen Stoffen die vorgeschriebene Wartezeit eingehalten werden muss und dass die gewonnenen Lebensmittel keine Rückstände oberhalb des jeweiligen MRL-Werts aufweisen dürfen. Milcherzeuger haben geeignete Maßnahmen zu ergreifen, damit ein Antibiotika-Eintrag in die Anlieferungsmilch vermieden wird (Albrecht und Baumgartner, 2007). Die Kontrollen hierzu überwacht die zuständige Behörde laut VO (EG) Nr. 854/2004.

Nicht zuletzt vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussionen um die wachsende Resistenzproblematik wurden von der Bundestierärztekammer und der Arbeitsgruppe Tierarzneimittel die „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ erstellt. Sie stellen die (bei jeder ordnungsgemäßen Behandlung gemäß § 1a und § 12 der TÄHAV geforderten) „Regeln der veterinärmedizinischen Wissenschaft“ für den Antibiotika-Einsatz dar (Bundesministerium für Gesundheit et al., 2011). Im Rahmen der „Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie“ (DART) wurden Strategien entwickelt, um das Auftreten und die Verbreitung von Resistenzen bei human- und tierpathogenen Bakterien zu reduzieren und gleichzeitig durch verantwortungsbewussten Antibiotika-Einsatz den Verbraucherschutz zu sichern, ohne die Tiergesundheit dabei zu beeinträchtigen (Bundesministerium für Gesundheit et al., 2011).

Seit dem Jahr 2011 werden im „Tierarzneimittelregister zur Erfassung von Abgabemengen von Antibiotika in Deutschland“ alle von der Industrie an Tierärzte abgegebenen Antibiotika jährlich regional erfasst, um mögliche Zusammenhänge zwischen dem Einsatz von Antibiotika und auftretenden Resistenzen zu erkennen. Die entsprechenden rechtlichen Grundlagen wurden in § 47 Abs. 1c sowie § 67a AMG in Verbindung mit der „Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information“ (DIMDI-Arzneimittelverordnung) geschaffen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2010).

Rückstände in Milch oder Milchprodukten werden demzufolge unterschiedlich beurteilt: während der Nachweis von Hemmstoffen gemäß Milch-Güteverordnung unabhängig von der Konzentration mit Milchgeldabzug geahndet wird, ist ein Antibiotika-haltiges Produkt

bei Überschreitung des jeweiligen MRL-Werts (also konzentrationsabhängig) unter lebensmittelrechtlichen Aspekten nicht verkehrsfähig. In den amtlichen Erläuterungen zur 5. VO zur Änderung der Milch-Güteverordnung wird deutlich gemacht, dass eine Hemmstoffuntersuchung nicht die Untersuchungen aus lebensmittelrechtlicher Sicht abdeckt (Suhren, 2002).

Weitere Details und Hintergrund-Informationen zur rechtlichen Situation bei Arzneimittelrückständen sind z. B. den entsprechenden Abschnitten der Dissertationen von Duelli (2008) oder Kress (2010) zu entnehmen.

### **3. Nachweisverfahren**

Schon vor etwa 100 Jahren wurde die Problematik des Übergangs von Arzneistoffen in die Milch erkannt (Bucura, 1907; Wesenberg, 1910). Mangels analytischer Methoden konnte diese Hypothese aber nicht weiter überprüft werden (Kirst, 2009). Nach Einführung der Antibiotika in die Veterinärmedizin und der schon frühzeitig beobachteten Hemmung von in der Milchindustrie verwendeten Starterkulturen, verursacht durch Antibiotika-Rückstände in der Milch, wurden ab den 50er Jahren in der Lebensmittelhygiene schließlich die ersten Rückstandsuntersuchungen basierend auf mikrobiologischen Hemmstofftests eingesetzt (Kraack und Tolle, 1967). Heute sind nicht nur aus Gründen der Lebensmitteltechnologie, sondern auch und vor allem im Hinblick auf den vorbeugenden Verbraucherschutz geeignete Verfahren zum Nachweis von Arzneimittel-Rückständen erforderlich. Man unterscheidet dabei zwischen qualitativen Verfahren, die darauf ausgelegt sind, eine möglichst große Probenanzahl auf das potentielle Vorliegen von Rückständen zu prüfen, und quantitativen Verfahren für den Nachweis von Substanzen mit gesetzlich festgelegten Höchstmengen. Indirekt dienen diese Kontrollen auch der Überwachung der arzneimittelrechtlich festgelegten Einhaltung von Wartezeiten, da bei Überschreitung der Rückstandshöchstmenge der Verdacht eines Verstoßes besteht (De Brabander et al., 2009; Großklaus, 1989; N. van Hoof et al., 2003).

Bis heute gibt es – auch aufgrund der sehr großen strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Antibiotika-Gruppen – jedoch kein geeignetes und praktikables Nachweisverfahren, mit dem Überschreitungen der Rückstandshöchstmengen in Milch für alle Antiinfektiva gleichzeitig und mit ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen werden können (Kress et al., 2007; Sternesjö, 2003; Suhren, 2002).

Innerhalb der zurzeit eingesetzten Nachweis-Verfahren kann man zwei Kategorien unterscheiden: Screening-Tests für die qualitative Analyse, um eine Ja-/Nein-Entscheidung zu geben, und Bestätigungsverfahren, mit denen außer dem qualitativen Ergebnis auch eine quantitative Aussage hinsichtlich eventueller Höchstmengen-Überschreitungen möglich ist. Wird ein derartiger Bestätigungstest nicht durchgeführt, gilt Milch, bei der ein Screening-Test zu einem positiven Ergebnis geführt hat, nach Einschätzung der Europäischen Kommission als nicht sicher (siehe Erwägungsgrund Nr. 5 der Entscheidung der Kommission vom 13. Oktober 2006 (2006/694/EG) zum Verbot des Inverkehrbringens des in einer Molkerei im Vereinigten Königreich hergestellten Frischkäses).

Außerdem sollten generell stichprobenweise zusätzlich zu den mikrobiologischen Verfahren andere Tests wie Rezeptor- oder Immun-Tests eingesetzt werden, da der beim üblicherweise verwendeten Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) eingesetzte Testkeim *B. stearothermophilus var. calidolactis* (*Geobacillus stearothermophilus*) Substanzgruppen wie Tetracykline, Aminoglykoside und Makrolide nicht ausreichend empfindlich erfasst.

### **3.1. Screening-Verfahren**

Screening-Tests werden in der Regel zum qualitativen Nachweis relevanter Konzentrationen von Stoffen eingesetzt und sind so konzipiert, dass ein hoher Probendurchsatz möglich ist. Dabei müssen sie einfach durchzuführen und kostengünstig sein. Ihre Sensitivität ist besonders wichtig, da falsch negative Proben ohne weitere Bestätigung in die Weiterverarbeitung gelangen würden (Brandt, 2007; De Brabander et al., 2009; N. van Hoof et al., 2003; Toldra und Reig, 2006).

#### **3.1.1. Mikrobiologische Hemmstofftests**

Mikrobiologische Testsysteme als einfache Screening-Verfahren für antimikrobielle Rückstände in Milch wurden bereits in den 60er Jahren verwendet und repräsentieren bis heute die bedeutendsten Analyse-Verfahren in der Routine-Diagnostik, insbesondere bei der Umsetzung der Bestimmungen der Milch-Güteverordnung. Es ist wahrscheinlich, dass sie auch in der näheren Zukunft nicht ersetzt werden (De Brabander et al., 2009). Das Grundprinzip dieser Untersuchungsverfahren ist die Wachstumshemmung eines Testkeims (meist *B. stearothermophilus*, aber auch andere wie z. B. *B. cereus* bei Tetracyklinen oder *E. coli* bei Chinolonen - Suhren, 2002), wenn die Probe Antibiotika enthält. Je nach Testformat wird das Vorhandensein von Hemmstoffen direkt durch einen resultierenden „Hemmhof“ (Blättchen-Test) oder indirekt durch den Farbumschlag eines Indikators (Redox-Indikator wie beim BRT oder pH-Indikator wie beim Deltotest) sichtbar.

Die Vorteile dieser Testverfahren bestehen darin, dass sie sehr einfach und kostengünstig durchzuführen sind (De Brabander et al., 2009); auch die Untersuchung vieler Proben gleichzeitig ist durch den hohen Probendurchsatz des automatisierbaren Verfahrens kein Problem (Companyo et al., 2009; De Brabander et al., 2009). Nachteilig sind die lange Inkubationszeit von durchschnittlich drei Stunden sowie die geringe Spezifität (Companyo et al., 2009; De Brabander et al., 2009; Mitchell et al., 1998; Navratilova, 2008). Hohe somatische Zellgehalte oder originäre Milchinhaltstoffe wie Lysozym oder Lactoferrin können zu falsch positiven Ergebnissen führen (Mitchell et al., 1998; Schenck und Callery, 1998). Außerdem können nicht alle Substanzen sicher auf MRL-Niveau nachgewiesen werden (Mitchell et al., 1998; Navratilova, 2008): so wird Chloramphenicol, für das ein Anwendungsverbot bei Lebensmittel liefernden Tieren und somit eine Nulltoleranz für Lebensmittel besteht, erst ab Konzentrationen von  $> 10$  mg/l nachgewiesen. Auch die meisten Aminoglykoside werden nur in sehr hohen Konzentrationen, die weit über dem MRL-Wert liegen, erfasst (Thal, 2006). Bei den Cephalosporinen kann vor allem Cefquinom mit fast keinem kommerziell erhältlichen mikrobiologischen Testverfahren sicher auf MRL-Niveau nachgewiesen werden (Tab. 5).

### **3.1.2. Enzymatische Tests**

Der erste, zu Beginn der 80er Jahre entwickelte Schnelltest (Navratilova, 2008) war der Penzym-Test (UCB-Bioproducts S.A., Belgien; Vertrieb in Deutschland durch Chr. Hansen GmbH, Nienburg). Er arbeitet mit dem Enzym DD-Carboxypeptidase (Cacciatore, 2005; De Brabander et al., 2009; Jones und Seymour, 1988; Neaves, 1999), das in allen Bakterien vorkommt und dort an der Zellwand-Synthese beteiligt ist (Mitchell et al., 1998). Bei Hemmstoff-freien Proben hydrolysiert dieses Enzym sein Substrat, D-Alanyl-D-Alanin, und das in der Reaktion freigesetzte D-Alanin wird in einer zweiten enzymatischen Reaktion zu Pyruvat und  $H_2O_2$  umgesetzt (Bartel et al., 2003; Mitchell et al., 1998). Durch eine Peroxidase wird in einem letzten Schritt schließlich ein Farbindikator oxidiert, so dass sich ein Farbumschlag von gelb zu orange-rosa ergibt, wenn die Probe Hemmstoff-frei ist (Cacciatore, 2005; Navratilova, 2008). In der Probe vorhandene  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hingegen inaktivieren durch deren Strukturverwandschaft zum eigentlichen Substrat die DD-Carboxypeptidase durch irreversible Komplexbildung (Navratilova, 2008). Die Auswertung ist innerhalb von 20 Minuten möglich und erfolgt anhand einer mitgelieferten Farbskala (Mitchell et al., 1998).

**Tabelle 5:** Kommerziell verfügbare mikrobiologische Nachweisverfahren für Antibiotika in Milch und deren Nachweisgrenzen für Cephalosporine. Grau hinterlegte Werte entsprechen Konzentrationen, die oberhalb des MRL-Werts (Angabe in Klammern unter dem jeweiligen Wirkstoff) liegen; d. h. die jeweiligen Antibiotika können mit dem entsprechenden Test nicht sicher auf MRL-Niveau nachgewiesen werden.

Test-Bezeichnung	Hersteller	Dauer (Std.)	Nachweisgrenzen (ng/ml)							
			Cefalexin (100)	Cefalonium (20)	Cefazolin (50)	Cefoperazon (50)	Cefquinom (20)	Ceftiofur (100)	Cefacetril (125)	Cefapirin (60)
BRT MRL	AIM	ca. 3	300 – 400 <sup>1</sup>	20 - 25 <sup>1</sup>	15 - 25 <sup>1</sup>	30 - 50 <sup>1</sup>	300 - 500 <sup>1</sup>	100 - 150 <sup>1</sup>	30 <sup>1</sup>	3 - 5 <sup>1</sup>
BR-Test AS Brilliant	DSM <sup>2</sup>	ca. 3 <sup>3</sup>	50 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	5 – 10 <sup>1</sup>	50 <sup>1</sup>	50 – 100 <sup>1</sup>	50 <sup>1</sup>	10 – 20 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup>
BR-Test AS Special	DSM <sup>4</sup>	k. A.	100 – 200 <sup>1</sup>	10 – 20 <sup>1</sup>	10 – 20 <sup>1</sup>	25 – 50 <sup>1</sup>	100 – 200 <sup>1</sup>	50 <sup>1</sup>	20 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup>
Copan Test <sup>5</sup>	Copan	2,5 - 3 <sup>5</sup>	> 45 <sup>5</sup>	k. A.	5 – 10 <sup>5</sup>	25 – 50 <sup>5</sup>	30 – 100 <sup>5</sup>	50 – 100 <sup>5</sup>	k. A.	2,5 – 5 <sup>5</sup>
CowSide® II <sup>6</sup>	Charm Sciences <sup>6</sup>	< 3 <sup>7</sup>	k. A.	15 – 20 <sup>6</sup>	k. A.	20 – 30 <sup>6</sup>	k. A.	50 – 100 <sup>6</sup>	k. A.	8 – 10 <sup>6</sup>
Delvotest SP <sup>5</sup>	DSM <sup>5</sup>	2,5 <sup>5</sup>	40 – 60 <sup>5</sup>	5 – 10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	40 <sup>5</sup>	100 <sup>5</sup>	50 <sup>5</sup>	20 <sup>5</sup>	5 <sup>5</sup>
Eclipse 100 <sup>7</sup>	Zeus Immunotec <sup>10</sup>	< 4 <sup>7</sup>	115 <sup>7</sup>	k. A.	k. A.	110 <sup>7</sup>	k. A.	85 <sup>7</sup>	k. A.	k. A.
Milchtest MT <sup>8</sup>	Packhaus Rockmann <sup>8</sup>	k. A.	400 <sup>8</sup>	k. A.	30 <sup>8</sup>	30 – 40 <sup>8</sup>	20 <sup>8</sup>	80 <sup>8</sup>	k. A.	20 <sup>8</sup>
Valio T 101 <sup>4</sup>	Valio Ltd <sup>4</sup>	4,5 <sup>9</sup>	50 - 100 <sup>4</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	50 - 100 <sup>2</sup>	20 - 30 <sup>4</sup>	k. A.	50 - 100 <sup>4</sup>

k. A. = keine Angaben

Quellen:

<sup>1</sup> = Quandt (2006); <sup>2</sup> = Thal (2006); <sup>3</sup> = Produktinfo: MILKU Tierhygiene GmbH (2011); <sup>4</sup> = Diserens (2002); <sup>5</sup> = Food Safety Authority of Ireland (2002); <sup>6</sup> = Produktinfo: Charm Sciences (2010b); <sup>7</sup> = Kantiani et al. (2009a); <sup>8</sup> = Produktinfo: Packhaus Rockmann GmbH (2011); <sup>9</sup> = Žvirauskienė und Šalomskienė (2007); <sup>10</sup> = Wang et al. (2011)

### 3.1.3. Rezeptortests

Rezeptortests funktionieren prinzipiell ähnlich wie Immuntests, jedoch erfolgt die Antigen-Bindung nicht an einen Antikörper, sondern an markierte bakterielle Penicillin-Bindungsproteine (PBPs). Als Marker werden heutzutage entweder Goldpartikel (z. B. „Charm ROSA“, Charm Sciences, Lawrence, USA; „beta-Star“, Chr. Hansen GmbH, Nienburg) oder Enzyme wie Meerrettichperoxidase (HRP; SNAP-Beta-Lactam Test, IDEXX GmbH, Wörrstadt) verwendet.

Die meisten dieser Tests sind als leicht durchführbare Schnelltests (i. d. R. drei bis 15 Min.) konzipiert, die v. a. von Molkereien zum Ausschluss einer Kontamination des Tankwagens genutzt werden und so helfen, enorme Verluste zu vermeiden. Nachteilig ist, dass sich bedingt durch den Einsatz Antibiotika-Klassen-spezifischer Rezeptoren mit diesen Tests nur jeweils eine Gruppe von Antibiotika, z. B.  $\beta$ -Lactame, nachweisen lassen. Außerdem ist aufgrund der geringen Kapazität der zur Testdurchführung notwendigen Thermoblock-Inkubations-Systeme immer nur die Analyse von wenigen Proben gleichzeitig möglich (Sternesjö, 2003). Mit den meisten Rezeptortests ist, im Gegensatz zu den mikrobiologischen Verfahren, jedoch der Nachweis von Cephalosporinen auf deren MRL-Niveau möglich.

Einen Überblick zu derzeit verfügbaren Schnelltestsystemen zum Nachweis von Cephalosporin-Rückständen in Milch und deren Nachweisgrenzen gibt Tab. 6.

### 3.1.4. Immunologische Tests

Immunologische Verfahren beruhen auf Antigen-Antikörper-Reaktionen, wobei die Bindung des Antikörpers durch verschiedene Marker sichtbar gemacht wird: beim in den 50er Jahren entwickelten, heute kaum noch eingesetzten Radioimmunassay (RIA) sind diese radioaktive Isotope, beim Fluoreszenzimmunoassay (FIA) fluoreszierende Verbindungen, beim Ende der 60er Jahre (Engvall und Perlmann, 1971) entwickelten Enzymimmunoassay (EIA) werden hingegen Enzyme als Marker (z. B. Meerrettichperoxidase; HRP) genutzt, die eine Farbreaktion katalysieren.

**Tabelle 6:** Kommerziell verfügbare Schnelltests (Rezeptor- und Immuno-Tests) zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch und deren Nachweisgrenzen für Cephalosporine. Grau hinterlegte Werte entsprechen Konzentrationen, die oberhalb des MRL-Werts (Angabe in Klammern unter dem jeweiligen Wirkstoff) liegen; d. h. die jeweiligen Antibiotika können mit dem entsprechenden Test nicht sicher auf MRL-Niveau nachgewiesen werden.

Test-Bezeichnung	Hersteller	Test-Prinzip	Dauer (Min.)	Nachweisgrenzen (ng/ml)							
				Cefalexin (100)	Cefalonium (20)	Cefazolin (50)	Cefoperazon (50)	Cefquinom (20)	Ceftiofur (100)	Cefacetil (125)	Cefapirin (60)
Beta s.t.a.r.	UCB Bioproducts <sup>1</sup> Chr. Hansen <sup>2</sup>	Rezeptortest	5 <sup>1</sup>	>1000 <sup>13</sup>	7,5 - 15 <sup>1</sup>	60 <sup>13</sup>	5 - 8 <sup>1</sup>	10 - 12,5 <sup>2</sup>	75 - 150 <sup>1</sup>	40 <sup>13</sup>	8 - 16 <sup>1</sup>
Charm II	Charm Sciences	Rezeptortest	8 - 15 <sup>3</sup>	30 <sup>3</sup>	k. A.	30 <sup>3</sup>	k. A.	15 - 20 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	k. A.	3 - 4 <sup>4</sup>
Charm ROSA® MRL-8 <sup>5</sup>	Charm Sciences	Rezeptortest <sup>5</sup>	8 <sup>5</sup>	30 - 60 <sup>5</sup>	3 - 5 <sup>5</sup>	12 - 20 <sup>5</sup>	5 - 9 <sup>5</sup>	15 - 20 <sup>5</sup>	30 - 60 <sup>5</sup>	8 - 18 <sup>5</sup>	6 - 10 <sup>5</sup>
Delvo-X-Press $\beta$ L-II <sup>1</sup>	DSM <sup>1</sup>	Rezeptortest <sup>1</sup>	< 7 <sup>1</sup>	25 - 50 <sup>1</sup>	3 - 4 <sup>1</sup>	k. A.	k. A.	5 - 20 <sup>1</sup>	4 - 8 <sup>1</sup>	k. A.	4 - 8 <sup>1</sup>
SNAP Beta-laktam Test <sup>6</sup>	IDEXX <sup>10</sup>	Rezeptortest	< 10 <sup>3</sup>	20 - 25 <sup>6</sup>	3 - 5 <sup>6</sup>	15 - 20 <sup>6</sup>	10 - 15 <sup>6</sup>	20 <sup>6</sup>	5 - 7 <sup>6</sup>	50 <sup>6</sup>	10 - 12 <sup>6</sup>
Penzym <sup>6</sup>	Chr. Hansen <sup>2</sup>	enzymatischer Test	20 <sup>7</sup>	20 - 40 <sup>5</sup>	10 - 15 <sup>6</sup>	k. A.	k. A.	50 <sup>2</sup>	40 - 70 <sup>6</sup>	k. A.	5 - 7 <sup>6</sup>
LacTek Test	IDEXX <sup>8</sup>	Immuno-Test	< 10 <sup>9</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	50 <sup>6</sup>	k. A.	20 <sup>6</sup>
Parallux $\beta$ -Lactam Test <sup>1</sup>	IDEXX <sup>1</sup>	Immuno-Test	4 <sup>1</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	33,7 <sup>1</sup>	k. A.	16,3 <sup>1</sup>

k. A. = keine Angaben

Quellen:

<sup>1</sup> = Food Safety Authority of Ireland (2002); <sup>2</sup> = Thal (2006); <sup>3</sup> = Kantiani et al. (2009a); <sup>4</sup> = Produktinfo: Charm Sciences (2010a); <sup>5</sup> = Produktinfo: MCS DIAGNOSTICS BV (2011); <sup>6</sup> = Meier (2008); <sup>7</sup> = De Brabander et al. (2009); <sup>8</sup> = Neaves (1999); <sup>9</sup> = Bell und Scannella (1994); <sup>10</sup> = Diserens (2002)

Immunoassays werden nach sehr unterschiedlichen Kriterien eingeteilt und können in vielerlei Variationen durchgeführt werden. Für den Nachweis niedermolekularer Verbindungen, wie sie die Cephalosporine darstellen, können allerdings nur kompetitive Verfahren realisiert werden, bei denen nachzuweisendes Antigen und markiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörper konkurrieren (Tijssen, 1985).

Hierbei kann zwischen direkten und indirekten Verfahren unterschieden werden. Bei direkt kompetitiven EIAs wird die Menge der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe direkt über ein enzymmarkiertes Antigen bestimmt. Indirekte Formate nutzen zur Quantifizierung der Antigen-Antikörper-Komplexe einen enzymmarkierten Sekundärantikörper, der an den primären Antigen-spezifischen Antikörper im Immunkomplex bindet.

Weiter ist für das Verständnis dieser Arbeit die Unterscheidung zwischen homologen und heterologen Systemen von Bedeutung. In einem homologen System werden sowohl zur Immunogensynthese als auch zur Herstellung des Antigen-Konjugates identische Haptene und Kopplungsverfahren eingesetzt. Bei heterologen Systemen gibt es verschiedene Heterologie-Varianten, die von Tijssen (1985) wie folgt eingeteilt wurden: (1) Hapten-Heterologie: ein anderes, zum Antigen verwandtes Hapten wird verwendet; (2) Brücken-Heterologie: ein anderes Kopplungsreagenz als bei der Herstellung des Immunogens wird verwendet und (3) Seiten-Heterologie: es wird an verschiedenen Positionen des Hapten-Moleküls gekoppelt.

Durch den Einsatz von heterologen Systemen kann prinzipiell in Abhängigkeit von der Affinität des im EIA verwendeten Antikörpers die Sensitivität des Immunoassays gesteigert werden (Van Weemen und Schuurs, 1975).

Da immunologische Verfahren schnell durchzuführen, kostengünstig und sowohl sehr sensitiv als auch spezifisch sind, werden sie – nicht nur in der Lebensmittelkontrolle – immer häufiger eingesetzt (Toldra und Reig, 2006). Zudem ist auch die simultane Bearbeitung mehrerer Proben möglich. Ihr Vorteil gegenüber anderen Screening-Verfahren ist die Möglichkeit, Hemmstoffe nicht nur zu identifizieren, sondern auch zu quantifizieren. Dazu sind generell nur geringe Anforderungen bei der Probenvorbereitung zu beachten. Nachteilig ist zum einen die je nach Format relativ lange Analyse-Zeit (Sternesjö, 2003), zum anderen dass ein „Multi-Residue“-Screening schwierig ist, da generische Antikörper selten sind (Companyo et al., 2009).

Beispiele für kommerziell erhältliche EIA-Schnelltests zum Cephalosporin-Nachweis sind z. B. der LacTek- und der Parallax-Test (beide Idexx Laboratories Inc., Maine, USA), die jedoch nur für den Nachweis von Cefapirin bzw. Ceftiofur verfügbar sind (Tab. 6).

In der Literatur wurden bisher lediglich für drei der acht für die Behandlung von Milchliefernden Tieren zugelassenen Cephalosporine, nämlich Cefalexin, Cefquinom und Ceftiofur, Immunoassays zum Nachweis dieser Rückstände in Milch beschrieben. Diese basierten hauptsächlich auf polyklonalen Antiseren, monoklonale Antikörper wurden bislang nur für Cefalexin und Ceftiofur entwickelt (Tab. 7). Zur Synthese der Immunogene wurden dabei unterschiedliche Kopplungsverfahren eingesetzt, ein besonders aufwändiges Verfahren wurde von Rose et al. (1995) für die Herstellung eines DFC-KLH-Konjugats beschrieben. Die Sensitivität der etablierten EIAs lag i. d. R. im unteren ng-Bereich und erlaubte somit den Nachweis der jeweiligen Cephalosporine weit unterhalb der für Milch festgelegten MRL-Werte.

Die produzierten Antikörper waren meist substanzspezifisch und wiesen nur Kreuzreaktionen mit sehr eng strukturverwandten Cephalosporinen auf. Eine Ausnahme bildete hier das von Xie et al. (2009) beschriebene polyklonale Antiserum gegen Cefalexin, das eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit einer breiten Palette von Cephalosporinen zeigte.

Die neueste Entwicklung im Bereich der immunologischen Nachweisverfahren für Antibiotika in Milch sind sog. Biosensoren. Sie basieren auf zwei Elementen: einem biologischen Rezeptor (üblicherweise ein Antikörper), an den der zu untersuchende Analyt bindet, sowie einem physikalischen Signalübertragungs-Element, das das biochemische Signal in ein elektronisches oder Lichtsignal überträgt und das in engem Kontakt zu einem Daten-Auswertungs-System steht (Märtlbauer, 2010; Toldra und Reig, 2006). Biosensoren arbeiten in Echtzeit und sind in der Lage, Rückstände in Proben simultan zu erkennen (Toldra und Reig, 2006). Ein häufig verwendetes Detektionsprinzip ist das sog. SPR-Phänomen (Surface Plasmon Resonance), das z. B. beim Nachweis von Sulfonamiden, Chloramphenicol, Streptomycin bzw. Chinolonen eingesetzt wurde (Fernandez et al., 2010; Rebe Raz et al., 2009). Auch für den Cephalosporin-Nachweis wurden ähnliche Systeme beschrieben (Cacciatore et al., 2004; Dillon et al., 2003).

**Tabelle 7:** In der Literatur beschriebene Immunoassay-Systeme zum Nachweis von Cephalosporinen in Milch

Cephalosporin (MRL, µg/kg)	Immunogen (Kopplungsmethode)	Antikörper (Spezies)	Antigen-Konjugat (Kopplungsmethode)	Nachweis- grenze für Milch (ng/ml)	Wiederfin- dungsrate in Milch (%)	Test- Format	Quelle
Cefalexin (100)	Cefalexin-KLH (EDC)	pAk (Kaninchen)	Cephalexin-AP (EDC)	1,0	90 – 110	FIIA	Meyer et al. (1999)
	Cefalexin-KLH (EDC)	pAk (Kaninchen)	Cephalexin-AP (EDC)	1,0	97 ± 23	FIIA	Zhi et al. (2001)
	Cefalexin-KLH (gA)	pAk (Kaninchen)	Cefalexin-HRP (EDC)	0,2 ± 0,1	100,1 – 132	EIA	Meier (2008)
	Cefalexin-KLH (gA)	pAk (Kaninchen)	Cefalexin-OVA (?)	5 – 10	71 – 98	EIA	Xie et al. (2009)
	Cefalexin-BSA (EDC/ NHS)	mAk (Maus)	Cefalexin-OVA (EDC)	19,5	82,8 – 124	EIA	Chen et al. (2009)
Cefquinom (20)	Cefquinom-KLH (gA)	pAk (Kaninchen)	Cefquinom-GlcOx (EDC)	1,5	80 – 128	EIA	Thal et al. (2011)
Ceftiofur (100)	DFC-KLH <sup>1</sup> (Sulfo-SMCC)	mAk <sup>2</sup> (Maus)	Ceftiofur-BSA <sup>3</sup> (EDC)	1,0 <sup>3</sup>	99,8 ± 18 <sup>3</sup>	EIA	<sup>1</sup> Rose et al. (1995) <sup>2</sup> Rose et al. (1996) <sup>3</sup> Stanker et al. (1998)
	Ceftiofur-KLH (gA)	pAk (Kaninchen)	Ceftiofur-BSA (EDC)	1,9 ± 1,0	88 – 138,7	EIA	Meier (2008)

Abkürzungen:

AP = Alkalische Phosphatase; BSA = Bovines Serumalbumin; EDC = Carbodiimid; EIA = Enzym-Immunoassay; FIIA = Flow Injection Immunoassay; gA = Glutaraldehyd; GlcOx = Glucose-Oxidase; HRP = Horseradish-Peroxidase; KLH = Keyhole limpet hemocyanin; mAk = monoklonaler Antikörper; OVA = Ovalbumin; pAk = polyklonaler Antikörper; Sulfo-SMCC = Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat

In Studien von Knecht et al. (2004) bzw. Kloth et al. (2009) wird die Entwicklung Multi-Analyt-fähiger, auf Antikörpern basierender Microarray-Verfahren – eines sog. PASA (parallel affinity sensor array) bzw. eines sog. CL-MIA (chemiluminescence microarray immunoassay)– berichtet. Die Fluidik auf diesen Mikroarray-Systemen („Biochips“) ist mit einem Chipreader kombiniert. Alle Analysenschritte laufen vollautomatisch ab; durch die Möglichkeit der Regenerierung der Chips sind repetitive Messzyklen durchführbar. Insgesamt ist diese für die Routineanalytik ausgelegte Technik in der Lage, verschiedenste Antibiotika innerhalb weniger Minuten nachzuweisen; aus der Gruppe der Cephalosporine war allerdings nur ein Cefapirin-Nachweisverfahren implementiert.

### **3.2. Bestätigungsverfahren**

Bestätigungsverfahren erlauben die eindeutige Identifizierung, und falls nötig auch Quantifizierung eines in einer Hemmstoff-positiven Probe vorhandenen Stoffes. Falsch positive Ergebnisse sollten ausgeschlossen sein (Brandt, 2007).

Für die Bestätigung von Antibiotika in Proben wurden viele chemisch-physikalische Verfahren beschrieben, eine Auswahl neuerer Arbeiten zum Nachweis von Cephalosporinen in Milch ist in Tab. 8 zusammengestellt.

Zu Beginn der 70er Jahre war die Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography, TLC) – oft kombiniert mit Fluoreszenz-Detektion – aufgrund ihrer Spezifität die Methode der Wahl für den quantitativen Nachweis verbotener Substanzen (De Brabander et al., 2009). Ein auf TLC basierendes, semi-quantitatives Nachweisverfahren für Cephalosporin-Rückstände in Milch wurde von Choma et al. (2008) für den Cefacetril-Nachweis beschrieben. Zur Sensitivitätssteigerung wurde hier ein mikrobiologischer Detektionsschritt, die sog. direkte Bioautographie, genutzt, die auch Aussagen über die antimikrobielle Aktivität des Analyten erlaubt. Die Detektion per Video-Kamera nach Auftrennung per TLC wurde von Grzelak et al. (2009) für den Cefacetril-Nachweis in Milch genutzt.

Da viele Antibiotika sehr polar, nicht-flüchtig und thermisch instabil sind, ist die Gaschromatographie (GC) für den Nachweis dieser Rückstände nur einschränkt einsetzbar (Di Corcia und Nazzari, 2002). Jedoch können auch unter Normaldruck nicht-flüchtige Stoffe einfach und quantitativ in flüchtige Derivate überführt und so mittels GC untersucht werden (Engelhardt, 1977) – dies trifft auch auf Penicilline zu, die nach Derivatisierung von Meetschen und Petz (1991) mittels GC nachgewiesen werden konnten. Für Cephalosporine hingegen wurde ein solches Nachweisverfahren bisher nicht beschrieben.

**Tabelle 8:** Physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Cephalosporin-Antibiotika in Milch

Analyse-Verfahren	Detektions-Schritt	Nachweisbare Cephalosporine <sup>1</sup>	Nachweisbarkeit in Milch		Quelle
			LOD (ng/ml)	WFR (%)	
TLC	direkte Bioautographie	Cefacetril	k. A.	k. A.	Choma et al. (2008)
TLC	Video-Kamera	Cefacetril	k. A.	98	Grzelak et al. (2009)
HPLC	UV-Detektion (270 nm)	Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom, Ceftiofur	7 – 11	69 – 93	Sorensen und Snor (2000)
HPLC	UV-Detektion (260 nm)	Cefalexin	10	90 – 92	Oliveira et al. (2007)
HPLC	UV-Detektion (265 nm)	Cefalexin	100	84 – 93	Samanidou et al. (2008)
HPLC	Diodenarray-Detektor	Cefalexin, Cefazolin, Cefoperazon, Ceftiofur	k. A.	93 – 107	Karageorgou und Samanidou (2010)
IP-LC	UV-Detektion (200 – 350 nm)	Ceftiofur	k. A.	91 – 100	Tyczkowska et al. (1993)
LC	ESI-MS/MS	Cefalexin, Cefazolin, Ceftiofur, Cefapirin	1 – 15	63 – 96	Daeseleire et al. (2000)
LC	ESI-MS/MS	Cefapirin, Desacetylcefapirin	1	~ 65	Heller et al. (2000)
LC	ESI-MS	Ceftiofur, Cefapirin	0,4 – 1	66 – 102	Bruno et al. (2001)
LC	ESI-MS/MS	Ceftiofur, Cefapirin	0,4 – 0,8	98 – 113	Holstege et al. (2002)
LC	UV-Detektion (270 nm)	Cefquinom	≤ 2	93	Suhren und Knappstein (2003)
LC	ESI-MS/MS	Cefalexin, Cefapirin	1	77 – 83	Ghidini et al. (2003)
LC	ESI-MS/MS	Cefalexin, Cefalonium, Cefapirin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom	k. A.	83 – 100	Becker et al. (2004)
LC	ESI-MS/MS	Cefalexin, Cefazolin, Cefoperazon, Ceftiofur	0,02 – 0,09	79 – 132	Kantiani et al. (2009b)
LC	ESI-MS/MS	Cefalexin, Cefazolin, Cefoperazon, Ceftiofur	0,2 – 2,12	93 – 134	Kantiani et al. (2010b)

<sup>1)</sup> berücksichtigt sind nur Wirkstoffe mit MRL; k. A. = keine Angabe, LOD = Nachweisgrenze, WFR = Wiederfindungsrate

Abkürzungen Analyse- und Detektionsverfahren:

ESI = Electrospray-Ionisation; IP-LC = Ionenpaarchromatographie; MS = Massenspektrometrie; MS/MS = Tandem-Massenspektrometrie; UV = Ultraviolett

Heutige Methoden der Wahl sind aufgrund der polaren, nicht-flüchtigen und hitze-sensitiven Eigenschaften der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Mitchell et al., 1998), die (Hochdruckflüssigkeits-)Chromatographie (HPLC bzw. LC) in Kombination mit fluoreszenzoptischen oder massenspektrometrischen Detektoren (De Brabander et al., 2009; Märtlbauer, 2010; Schenck und Callery, 1998; Shaikh und Moats, 1993). Im Gegensatz zu Penicillinen können Cephalosporine aufgrund ihrer guten UV-Absorptionseigenschaften aber auch ausreichend empfindlich mit UV-Detektion oder unter Verwendung eines Diodenarray-Detektors nachgewiesen werden. HPLC-Verfahren, die diese Detektions-Schritte nutzen, wurden z. B. von Sorensen und Snor (2000) und Karageorgou und Samanidou (2010) zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Cephalosporine oder von Oliveira et al. (2007) und Samanidou et al. (2008) zum Cefalexin-Nachweis in Milch beschrieben.

Auch Flüssigkeits-/Ionenpaarchromatographie mit UV-Detektion wurde für den Cefquinom- bzw. Ceftiofur-Nachweis etabliert (Suhren und Knappstein, 2003; Tyczkowska et al., 1993).

In den meisten neueren Studien zum rückstandsanalytischen Nachweis wurden jedoch zum Nachweis der Cephalosporine die Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verwendet, wobei immer die Elektronenstoß-Ionisation (ESI) als Ionenquelle eingesetzt wurde (Becker et al., 2004; Daeseleire et al., 2000; Ghidini et al., 2003; Heller et al., 2000; Holstege et al., 2002; Kantiani et al., 2010a; Kantiani et al., 2009b).

Verwendete Fließmittel für die Auftrennung sowie Ionisationsquellen des Massenspektrometers werden hierbei i. d. R. so gewählt, dass die gesamte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Gruppe (Penicilline und Cephalosporine) parallel nachgewiesen werden kann.

Der große Vorteil dieser Verfahren ist, dass der spezifische und quantitative Nachweis von bereits geringen Substanz-Konzentrationen möglich ist. Für den Einsatz in der Routinediagnostik, also zum Screening großer Probenmengen, sind sie allerdings weniger geeignet: nachteilig ist, dass diese Verfahren sehr kostenintensiv (teure Geräteanschaffung, hohe Personalkosten für hochqualifizierte Mitarbeiter) sind und des Weiteren in der Regel eine aufwändige Probenvorbereitung mit Extraktion und Aufreinigung des Analyten notwendig sind (Shaikh und Moats, 1993).

### III. PUBLIKATION

#### **A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk**

Anna Bremus<sup>1</sup>, Richard Dietrich<sup>1</sup>, Lars Dettmar<sup>1</sup>, Ewald Usleber<sup>2</sup>, Erwin Märtlbauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department for Veterinary Sciences, Chair for Hygiene und Technology of Milk, Ludwig-Maximilians-University München, Schönleutnerstraße 8, 85764 Oberschleißheim, Germany*

<sup>2</sup> *Veterinary Faculty, Chair of Dairy Science, Justus Liebig University, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen, Germany*

#### **Abstract**

A simple, efficient and rapid method for the synthesis of cephalosporin–protein conjugates was established. These conjugates were used as immunogens to produce monoclonal antibodies (mAbs) and as solid phase antigens in competitive indirect enzyme immunoassays (EIAs). With this generic approach, a novel set of monoclonal antibodies for cephalosporins was prepared, including ceftiofur and cephalexin as well as, reported here for the first time, cefoperazone, cefquinome and cephapirin. All 5 EIAs were highly sensitive, with standard curve IC<sub>50</sub> values of 0.7 (ceftiofur), 1.1 (cefquinome), 5.2 (cephalexin), 13.8 (cefoperazone) and 40.3 ng mL<sup>-1</sup> (cephapirin). Detection limits (IC<sub>30</sub>) ranged from 0.3 (ceftiofur mAb 1D7) to 17.2 ng mL<sup>-1</sup> (cephapirin mAb 2F10). Specificity studies revealed that cephalosporin–antibody binding was strongly determined by the side chain residues of the cephem nucleus. Therefore all mAbs, to some extent, recognized other beta-lactam antibiotics with similar side chain residues. Within the group of cephalosporins approved for use in veterinary medicine, however, the final EIAs were highly selective for their respective antigen, except of the ceftiofur EIA which showed cross-reactions with cefquinome. The applicability of the five assays for drug residue testing in milk was demonstrated. In each EIA the target drug could be determined in milk with high accuracy and precision at concentrations far below the European Union maximum residue limits.

**Keywords:** *Cephalosporins, Enzyme immunoassay, Milk, Monoclonal antibodies, Residues*

### **Abbreviations:**

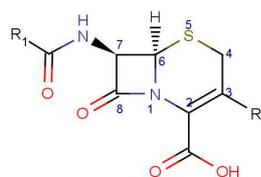
7-ACA, 7-aminocephalosporanic acid; BSA, bovine serum albumin; EDC, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide; EIA, enzyme immunoassay; EPB, (R)-(-)- $\alpha$ -[[[4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinyl]carbonyl]amino]-4-hydroxybenzeneacetic acid; EU, European Union; GlcOx, glucose oxidase; HRP, horseradish peroxidase; KLH, keyhole limpet hemocyanin; LOD, limit of detection; mAb, monoclonal antibody; MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate; MRL, maximum residue limit; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; PBS, phosphate buffered saline

### **Introduction**

The beta-lactam antibiotics, namely the penicillin and cephalosporin subgroups, are still among the most important pharmaceuticals for the therapy and prevention of infectious diseases in food-producing animals. The cephalosporins, structurally characterized by a six-membered dihydrothiazine ring fused to a beta-lactam ring, are semi-synthetic antibiotics derived from cephalosporin C, which is produced by *Cephalosporium acremonium* [1-2]. The first-generation cephalosporins have been introduced in antibacterial therapy in human medicine in the 1960s. These were followed by several “generations” of structurally modified cephalosporins, aimed at enhancing their antimicrobial properties against gram-negative bacteria [3]. In particular, third- and fourth generation cephalosporins such as cefquinome and ceftiofur are frequently used in the therapy of infectious diseases in food-producing animals including dairy cows [4]. Compared to other antibiotics used in veterinary medicine, cephalosporins have relatively short withdrawal periods for milk, which makes their use economically attractive. At present, eight cephalosporins (Fig. 1) are approved for the treatment of food-producing animals within the European Union (EU). However, drug preparations based on the first generation cephalosporins, cefacetrile or cefalonium, are currently not available, at least in Germany.

Non-compliance with withdrawal periods or extra-label use of cephalosporins implies the risk that residues occur in milk [5], which can have serious adverse effects: they can cause allergic reactions in beta-lactam sensitized persons, interfere with manufacturing of dairy products by inhibition of bacterial starter cultures and may promote the development of pathogenic bacteria resistant to antibiotics [6-9].

**Cephem nucleus**



Cephalosporin	MRL ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	R <sub>1</sub> =	R <sub>2</sub> =
Cefalonium	20		
Cefazolin	50		
Cefoperazone	50		
Cefquinome	20		
Ceftiofur	100		
Cephacetrile	125		
Cephalexin	100		-CH <sub>3</sub>
Cephapirin	60		

**Fig. 1** Structures of cephalosporins for which an MRL has been set within the EU

Therefore an efficient control system for cephalosporin residues in milk is essential in aspects both of public health and of good dairy practice. Specific maximum residue limits (MRLs), which may be regarded as “safe levels”, for antibiotics approved for treatment of food-producing animals have been set within the EU [10]. The respective MRLs for cephalosporins in milk (Fig. 1) range from 20 (cefquinome) to 125  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (cephacetrile). This requires the availability of sensitive, selective and quantitative analytical methods for each compound.

Physicochemical methods (*e.g.* LC-MS/MS) [11-15], which enable quantitative determination of individual antibiotics, are costly, time-consuming and require skilled personnel. Therefore these techniques are mainly used for the confirmation of positive screening results and for statutory purposes.

The vast majority of tests for antimicrobial residues in milk is currently done by microbiological screening tests or by beta-lactam receptor tests [16-20], which are easy to perform and cheap, but lack selectivity, *i.e.* do not allow substance identification and give only qualitative or, at best, semiquantitative results. Furthermore, they do not necessarily detect all MRL-regulated cephalosporins with the required sensitivity [21]. The latter is particularly true for cefquinome and ceftiofur, two cephalosporins which are increasingly used during the last years for the treatment of dairy cattle. In particular, microbiological inhibitor tests used in official bulk milk control systems lack sensitivity for cefquinome and for the ceftiofur marker residue, desfuroylceftiofur.

Thus, the availability of selective and quantitative immunoassays, in addition to group specific assays, would be desirable to fill the gap between screening and confirmatory methods. Recently Kloth et al. [22] described a fully automated and rapid antibody-based biosensor which quantitatively determines antibiotic residues in milk. Prerequisite for such systems is the availability of specific antibodies, preferentially monoclonal antibodies (mAbs). However, only a few studies so far dealt with the production of specific antibodies against cephalosporins. Most authors focussed on polyclonal [23-27] or monoclonal [28-29] antibodies against cephalexin, while only each one study reported the production of polyclonal [26] or monoclonal [30] antibodies against ceftiofur. Recently, a rabbit antiserum enabling the specific detection of cefquinome has been described [31]. As yet, no antibodies have been described for the detection of the other MRL-regulated cephalosporins.

In this paper, we describe the production and characterization of mAbs against five of the most important cephalosporins used in veterinary medicine. Cephalosporin–protein conjugates required for the immunization and development of the enzyme immunoassays (EIAs) were prepared by a standardized, uniform coupling procedure. The generic applicability of this approach was demonstrated by the successful production of mAbs against ceftiofur and cephalexin. Furthermore, we report here for the first time the production of mAbs enabling the selective detection of cefoperazone, cefquinome and cephalirin.

### **Experimental: materials and methods**

#### Reagents and buffers

Amoxicillin, ampicillin, benzylpenicillin, cefalonium, cefazolin, cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime, cephalexin, cephalosporin C, cephalothin, cephradine, cloxacillin, dicloxacillin, nafcillin, oxacillin, piperacillin, 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) and (R)-(-)- $\alpha$ -[[[4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinyl)carbonyl]amino]-4-hydroxybenzeneacetic acid (EPB) were purchased from Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany. Cefmenoxime, cefotiam and ceftizoxime were obtained from USP, Rockville, USA; cefodizime and cefpirome from Molekula Deutschland Ltd., Taufkirchen, Germany. Cephadroxile was received from ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA; cephalirin from MP Biomedicals Europe, Illkirch, France; cefaclor from Alexis Biochemicals (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany); cefquinome from Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany; ceftiofur from Riedel-de-Haen, Seelze, Germany; cephacetrile from Novartis Tiergesundheits GmbH, Nürnberg, Germany and 1-ethylpiperazine-2,3-dione from Alfa aesar, Karlsruhe, Germany. Desfuroylceftiofur was from United States Biological, Swampscott, MA, USA.

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) was purchased from Pierce, Rockford, USA. Glucose oxidase (GlcOx), horseradish peroxidase (HRP), bovine serumalbumin (BSA), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES), Tween 20, sodium caseinate and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany.

Antibiotic stock solutions (1 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared daily in phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M phosphate buffer containing 0.1M NaCl, pH 7.3). Working standard solutions

for EIA were prepared in PBS. For the analysis of fortified milk, standard solutions were prepared either in reconstituted skimmed milk powder (100 g L<sup>-1</sup> distilled water) or in commercial skimmed UHT milk (0.1% fat). To test the reactivity of alkali-hydrolyzed cephalosporin metabolites in EIA, stock solutions of each compound (1 mg mL<sup>-1</sup>) were made with PBS/1 M NaOH (98/2) and incubated at ambient temperature overnight. Due to the cleavage of the beta-lactam ring, this procedure resulted in the complete loss of antimicrobial activity, as determined by a microbial inhibition assay (BRT inhibitor test, AiM, München, Germany).

The buffer for the coating of the microtitre plates (Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany) was PBS, thus avoiding alkaline cleavage of the cephalosporins. Wash solution was distilled water containing 8.55 g L<sup>-1</sup> NaCl and 0.25 mL L<sup>-1</sup> Tween 20. Blocking buffer was PBS containing 30 g L<sup>-1</sup> sodium caseinate. Working solutions of the enzyme conjugates were prepared with PBS containing 10 g L<sup>-1</sup> sodium caseinate. The enzyme substrate/chromogen solution consisted of 200 mmol L<sup>-1</sup> potassium citrate buffer (pH 3.9) containing 3 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 mmol L<sup>-1</sup> TMB.

#### Synthesis of hapten–protein conjugates

##### *Synthesis of conjugates via EDC/NHS coupling*

For use as immunogens, the cephalosporins were coupled to KLH, whereas BSA and GlcOx conjugates [32] served as coating-antigens in the indirect EIAs. The cephalosporins under study, i.e. cefoperazone, cefquinome, ceftizoxime, cephalexin and cephapirin, were coupled via their carboxyl-group using a modification of the two-step zero-length activated ester method described by Grabarek and Gergely [33]. In a typical experiment, each of the reagents (28 μM cephalosporin, 43 μM NHS, 46 μM EDC) was dissolved in 100 μL aqueous MES buffer (0.1 M MES, 0.5 M NaCl; pH 6.0), mixed together and incubated for 20 min with stirring at room temperature. Subsequently, 5.0 mg of the carrier protein (KLH, BSA or GlcOx) dissolved in 1 mL 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) was added dropwise to the solution and the mixture was stirred for 2 h at room temperature in the dark. Finally, the product was dialysed for 72 h against 3 changes of each 5 L PBS.

##### *Synthesis of conjugates via EDC-only coupling*

To prepare alternative coating antigens, some of the cephalosporins under study were also coupled to macromolecules (BSA or GlcOx) directly with EDC, without NHS ester

formation. For this purpose, 12  $\mu\text{M}$  of the antibiotic was dissolved with MES buffer (1 mL). GlcOx or BSA (120 nM in 0.8 mL MES buffer) and EDC (12  $\mu\text{M}$  in 0.3 mL MES buffer) were added, and the mixture was incubated at ambient temperature for 24 h. Then the conjugates were dialysed against PBS as described above. Using a similar approach, an EPB-horseradish peroxidase (EPB-HRP) conjugate was prepared which served as labelled antigen in a direct EIA for the detection of cefoperazone.

#### Immunization and hybridoma production

Female mice [BALB/c strain and a hybrid strain of BALB/c  $\times$  (NZW  $\times$  NZB)] were immunized by intraperitoneal injection of 60  $\mu\text{g}$  of cephalosporin-KLH conjugate, dissolved in 100  $\mu\text{L}$  PBS and emulsified in Freund's complete adjuvant (1 + 2). Booster injections, using Freund's incomplete adjuvant and 50  $\mu\text{g}$  of the same immunogen, were given 14 weeks after the primary injection. If necessary, mice were boosted again by subcutaneous injection using the same composition and amount of immunogen as for the first restimulation. Finally, 3 days before fusion, mice exhibiting both high serum antibody titres and high antibody affinity for free antigen, received a final booster injection of 75  $\mu\text{g}$  of antigen in 300  $\mu\text{L}$  PBS alone. Cell fusion using X63-Ag8.653 myeloma cells was performed as previously described [34]. Culture supernatants were tested for cephalosporin-specific antibodies 12 days after fusion in non-competitive indirect EIAs with the respective cephalosporin-protein conjugate as the solid phase. Positive hybridomas were cloned at least three times by a limiting dilution technique.

Selected clones were mass produced in a Mini-Perm bioreactor (Sarstedt, Nürnbrecht, Germany) and the mAbs subsequently isolated and purified by affinity chromatography on protein A-agarose (BioRad, München, Germany). The immunoglobulin subtype of the mAbs was determined by using mouse monoclonal antibody isotyping reagents purchased from Sigma-Aldrich. To check the affinity of the monoclonal antibodies for free cephalosporin, checkerboard titrations of different concentrations of mAb vs. coating antigen with and without cephalosporin standard solutions (50  $\text{ng mL}^{-1}$ ) were performed. Optimal working concentrations for coating antigen and antibodies in the competitive indirect EIA were selected on the basis of two criteria: a maximum relative inhibition caused by free antigen under the competitive conditions and at the same time a sufficiently strong measurement signal (absorbance value 1.0–1.2 units) of the antigen free control.

### Enzyme immunoassay development

The general EIA protocol was as follows: microtitre plates were coated overnight at ambient temperature with cephalosporin-BSA or cephalosporin-GlcOx conjugates (100  $\mu\text{L}$  per well). Free binding sites of the wells were blocked with blocking solution (150  $\mu\text{L}$  per well) for 30 min and then the solvent was removed. Subsequently, mAb solution (50  $\mu\text{L}$  per well) and various concentrations of analytes (50  $\mu\text{L}$  per well) were simultaneously added to the conjugate coated microplates and incubated for 1 h. After washing, rabbit anti-mouse Ig-HRP conjugate solution (1:2,000) was added (100  $\mu\text{L}$  per well) and incubated for 1 h at room temperature. The plate was washed again, and enzyme substrate/chromogen solution was added (100  $\mu\text{L}$  per well). After 20 min, the enzyme reaction was stopped by the addition of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 mol  $\text{L}^{-1}$ , 100  $\mu\text{L}$  per well) and the absorbance of each well was measured at 450 nm by an EIA plate reader (Sunrise RC microplate reader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany). The absorbance data were processed with Ridawin EIA calculation software (r-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany).

For the determination of the relative antibody titre of the mice sera, and for detection of antibody secreting hybridomas, microtitre plates were coated overnight at room temperature with fixed concentrations (0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of the respective cephalosporin protein conjugates. To check the affinity of the monoclonal antibodies for free cephalosporin, checkerboard titrations of different concentrations of mAb vs. coating antigens with and without cephalosporin standard solutions were performed. Optimal working concentrations for coating antigen and antibodies in the indirect EIA (see Electronic Supplementary Material Table S1) were selected based on the relative inhibition caused by free antigen under the competitive conditions and the absorbance value (1.0–1.2) of the antigen free control. Quadruplicate wells were routinely analysed for all standard and sample solutions. The 50% inhibition concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) and the limit of detection (LOD) served as criteria to evaluate the EIAs. The LOD was defined from the end of the quasilinear range of the standard curve, corresponding to a concentration resulting in 30% binding inhibition ( $\text{IC}_{30}$ ). Working range of the EIAs was defined to lie within a region between 10% and 70% of the maximum blank value. For cross-reactivity studies, a large set of 33 beta-lactam antibiotics (all MRL-listed cephalosporins and penicillins, plus 14 other cephalosporins listed under “reagents and buffers”) was tested in each EIA at concentrations up to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The relative cross-reactivity (CR) of each antibiotic in

each test system was calculated from the individual EIA standard curves according to the following formula:

$$\text{CR (\%)} = \text{IC}_{50} (\text{mol L}^{-1}) \text{ for the main analyte} / \text{IC}_{50} (\text{mol L}^{-1}) \text{ for the compound tested} \times 100$$

### *Sample preparation*

The applicability of the different EIAs for milk analysis was studied by spiking whole milk (fat content approximately 3.5%) with the respective cephalosporin at concentrations corresponding to 50%, 100% and 200% of the respective MRL. The milk samples were then defatted by centrifugation (3,000 ×g; 15 min, 4 °C) and the skim milk directly analysed by EIA. Cephalosporin standard solutions and higher dilutions of spiked milk samples (if necessary) were prepared either in UHT milk (EIAs for cefoperazone and cephalixin) or in reconstituted skimmed milk powder (100 g L<sup>-1</sup>; all other assays).

**Table S1** Concentrations of immunoreagents used in the optimized competitive indirect EIAs for the determination of cephalosporins in buffer solution

Target drug	MAb		Coating Antigen*	
	Name	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )	Name	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )
Cefoperazone	2G1	50	Cefoperazone-NHS-BSA	15
		80	Cefoperazone-EDC-GlcOx	250
Cefquinome	3G9	60	Cefquinome-NHS-BSA	500
	1C6	80		500
	2E6	40		200
	3H2	125		300
Ceftiofur	1D7	70	Ceftiofur-NHS-BSA	15
	2G4	500		15
	2H6	100		15
	1H7	100		15
Cephalexin	1F10	10	Cephalexin-NHS-BSA	15
		10	Cephalexin-EDC-BSA	25
Cephapirin	2F10	10	Cephapirin-NHS- GlcOx	200
		10	Cephapirin-EDC-GlcOx	40

\*NHS: conjugate prepared by twostep EDC/NHS crosslinking; EDC: conjugate prepared by one-step EDC-only crosslinking

## Results and discussion

### Antibody production

Different approaches have been described to produce immunogenic cephalosporin conjugates, including the use of bifunctional coupling reagents such as glutaraldehyde [24,26,31], *o*-phthaldialdehyde [35], and carbodiimide [23,25,27,29], or heterobifunctional NHS-ester cross-linking reagents [36]. In most cases the cephalosporin-protein conjugation was performed at physiological or slightly acidic pH conditions to avoid cleavage of the beta-lactam ring. Combining different aspects of the previously published approaches, a simple, rapid and easy to perform coupling procedure was established, enabling the efficient coupling of cephalosporins via their carboxylic group to macromolecules. This two-step method, which was originally described by Grabarek and Gergely [33] for protein-protein cross-linking, produces an *O*-acylisourea derivative of cephalosporin and EDC in a first step. In the presence of NHS, the cephalosporin derivative is converted into its succinimidyl ester, which after addition of the protein undergoes substitution with free amino groups. The advantage of this procedure over direct one-step conjugation with EDC is that side reactions of the coupling reagent with proteins are minimized, while still giving zero-length cross-linking of the residue to the protein [33]. Blocking of free, unreacted EDC with mercaptoethanol before addition of the protein, as recommended by these authors, could be omitted in our experiments for synthesis of immunogens and solid phase antigens, without unwanted non-specific binding effects being observed in EIA.

Since the cephalosporins under study have an UV absorption maximum at  $260 \pm 10$  nm, overlapping with the absorbance of the carrier proteins, a quantitative estimation of the conjugation ratios was not possible. However, compared with the original carrier proteins, a marked change in the UV absorption properties of all cephalosporin-protein conjugates was observed, shifting the maximum absorbance from approximately 280 to 260–270 nm, which is in agree with the absorbance pattern of the antibiotics (details not shown).

To produce immunogens for the detection of cefoperazone, cefquinome, cephalixin and cephapirin, the parent compound was each used as the hapten, whereas for the development of antibodies against ceftiofur, a different approach was chosen. The reasons for this decision were the reported low immunogenicity of ceftiofur conjugates [26,36] and, more importantly, the fact that for this antibiotic the MRL is defined as the “sum of all residues retaining the beta-lactam structure expressed as desfuroylceftiofur”. Therefore,

antibody-based screening methods for this cephalosporin must be able to detect desfuoylceftiofur. Ceftizoxime, which is structurally related to ceftiofur but lacks the side chain at the 3- $\alpha$  position of the 7-ACA (cephem) nucleus, seemed to be a suitable hapten to elicit antibodies which are reactive with both ceftiofur and desfuoylceftiofur.

Except for cefoperazone, all cephalosporin conjugates used in this study were found to be highly immunogenic. Nearly all immunized mice developed cephalosporin-specific antibodies and, even after one single injection, high specific antibody titres were found (see Electronic Supplementary Material Table S2). Thus, these findings corroborate the efficiency of the coupling procedure applied in this work. In contrast, previously described approaches for the production of anti-cephalosporin antibodies were partly hampered by the low immunogenicity of the applied protein–conjugates [27,31,36].

**Table S2** Antiserum titres of mice immunized with cephalosporin-KLH conjugates

Immunogen		Bleed	
		first	second
Cefoperazone-KLH	responder*	4/5	4/4
	mean titre	2,000	64,000
Cefquinome-KLH	responder	4/4	4/4
	mean titre	16,000	32,000
Ceftizoxime-KLH	responder	4/4	4/4
	mean titre	128,000	256,000
Cephalexin-KLH	responder	5/5	4/4
	mean titre	16,000	256,000
Cephapirin-KLH	responder	4/5	3/4
	mean titre	8,000	32,000

\* number of mice with detectable antibody titre vs. number of mice tested

#### Characterization of antibodies

Using established cell-fusion techniques, a broad range of mAbs, mostly of the IgG subtype (Table 1), could be obtained in this study. In competitive EIA systems, these mAbs enabled the sensitive detection of cephalosporins approved for the treatment of food animals.

**Table 1** Characteristics of the mAbs and standard curve parameters of the optimized competitive indirect EIAs for determination of cephalosporins in buffer solutions

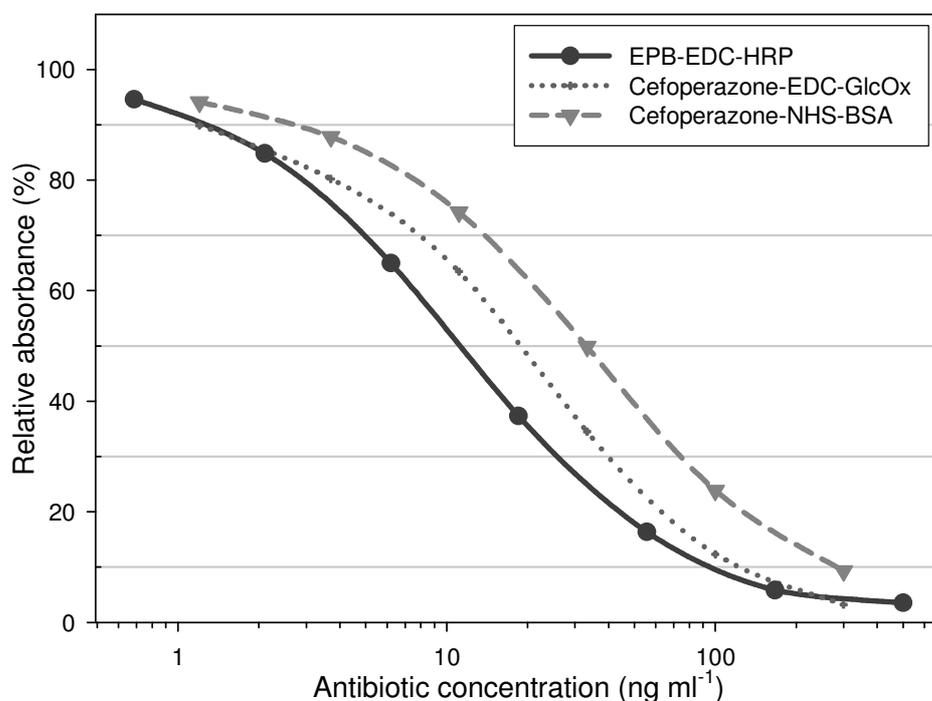
Target drug (MRL for milk)	MAb		Coating antigen <sup>a</sup>	EIA	
	Name	Immuno- globulin sub-type		LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )
Cefoperazone (50)	2G1	IgG <sub>1</sub>	Cefoperazone- NHS-BSA	11.8	32.5
			Cefoperazone- EDC-GlcOx	10.6	21.0
Cefquinome (20)	3G9	IgG <sub>1</sub>		0.40	1.10
	1C6	IgG <sub>3</sub>	Cefquinome- NHS-BSA	3.70	12.9
	2E6	IgG <sub>1</sub>		1.00	2.80
	3H2	IgG <sub>2a</sub>		13.6	40.5
Ceftiofur (100)	1D7	IgG <sub>1</sub>		0.30	0.70
	2G4	IgM	Ceftizoxime- NHS-BSA	0.50	1.70
	2H6	IgG <sub>1</sub>		1.70	4.00
	1H7	IgG <sub>1</sub>		1.40	3.00
Cephalexin (100)	1F10	IgG <sub>1</sub>	Cephalexin-NHS- BSA	3.20	8.30
			Cephalexin-EDC- BSA	2.70	5.20
Cephapirin (60)	2F10	IgG <sub>2a</sub>	Cephapirin-NHS- GlcOx	23.4	67.0
			Cephapirin-EDC- GlcOx	17.2	40.3

<sup>a</sup>NHS, conjugate prepared by two-step EDC/NHS cross-linking; EDC, conjugate prepared by one-step EDC-only cross-linking

Using solid phase antigens prepared by the homologous EDC/NHS method, detection limits in buffer solutions (Table 1) ranged from 0.3 (mAb 1D7 against ceftiofur) to 23.4 ng mL<sup>-1</sup> (mAb 2F10 against cephapirin). Besides the EDC/NHS method, coating antigens were also synthesized by a modified procedure using the zero-length-cross-linker EDC without NHS (EDC-only). Unexpectedly, the implementation of the latter conjugates in the indirect EIAs for the detection of cefoperazone, cephalexin and cephapirin resulted in a remarkable and reproducible improvement of the assay sensitivity of about factor 1.5 (Table 1). As both methods theoretically led to identical conjugates the reason for this striking observation is unclear. Possibly, considering the known instability of beta-lactam

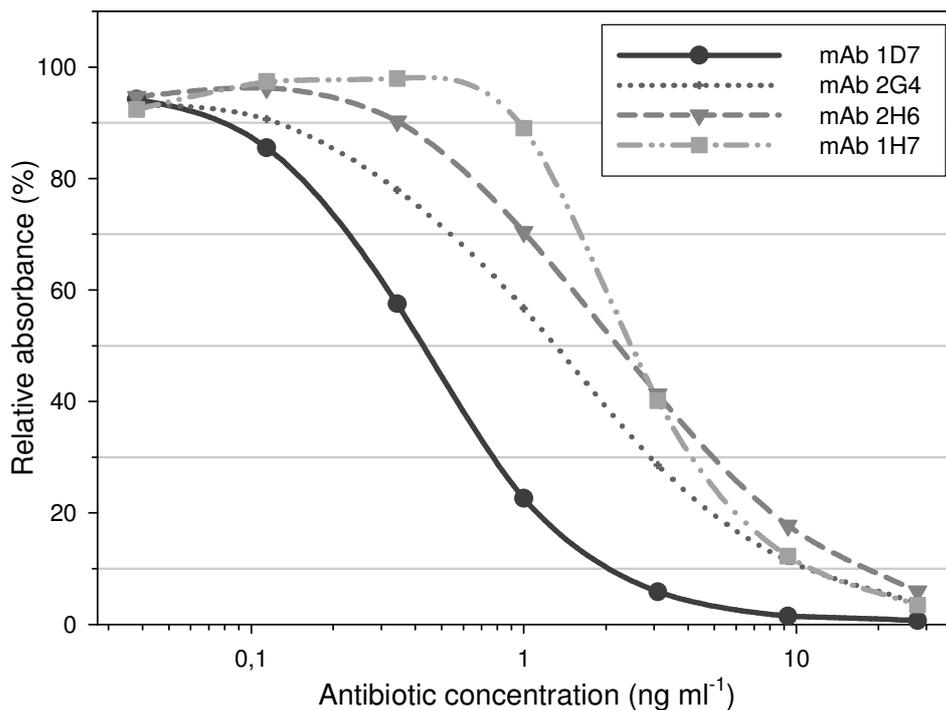
antibiotics in aqueous solutions, a slight degradation of the cephalosporins occurred during the longer incubation period applied in the EDC-only coupling procedure (24 vs. 2.33 h). This degradation may alter the affinity of the mAb for the labelled antigen and thus influence the sensitivity of the EIA system.

In a further attempt to increase the sensitivity of the cefoperazone assay the effect of using a hapten-heterologous labelled antigen in the EIA was studied. For this purpose, EPB, representing the C-7 substituent of cefoperazone was coupled to peroxidase by the EDC-only method. This EIA variant resulted in a marked increase of the assay sensitivity ( $IC_{50}$ ) from  $21.0 \pm 1.5$  to  $13.8 \pm 2.1$  ng mL<sup>-1</sup> (Fig. 2).

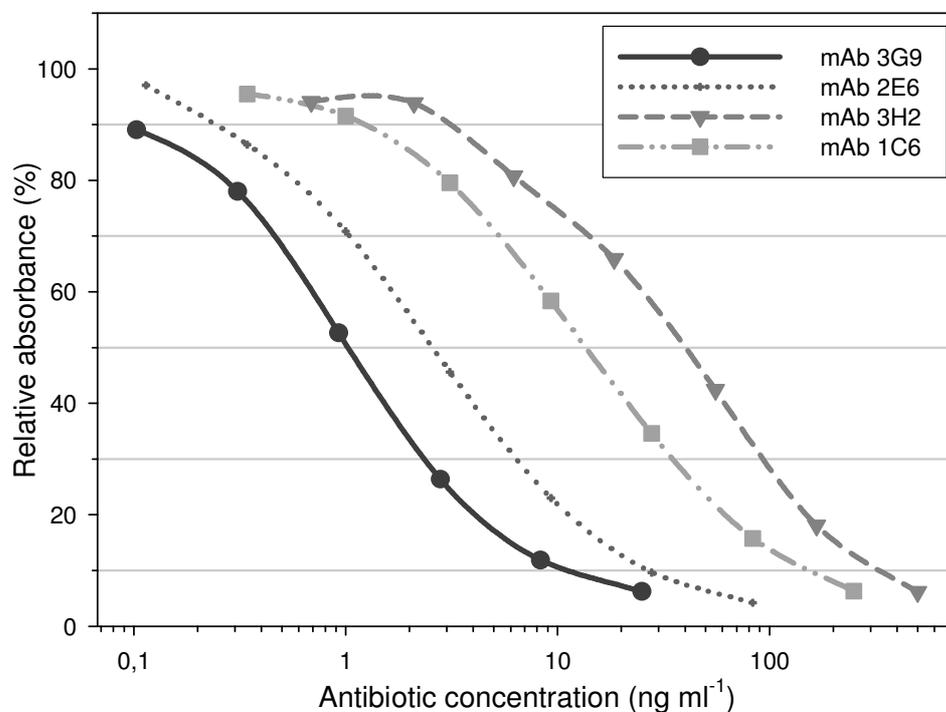


**Fig. 2** Standard curves for the detection of cefoperazone using mAb 2G1 in indirect or direct EIA formats. The coefficients of variation for replicate standard concentrations were typically below 8.6%

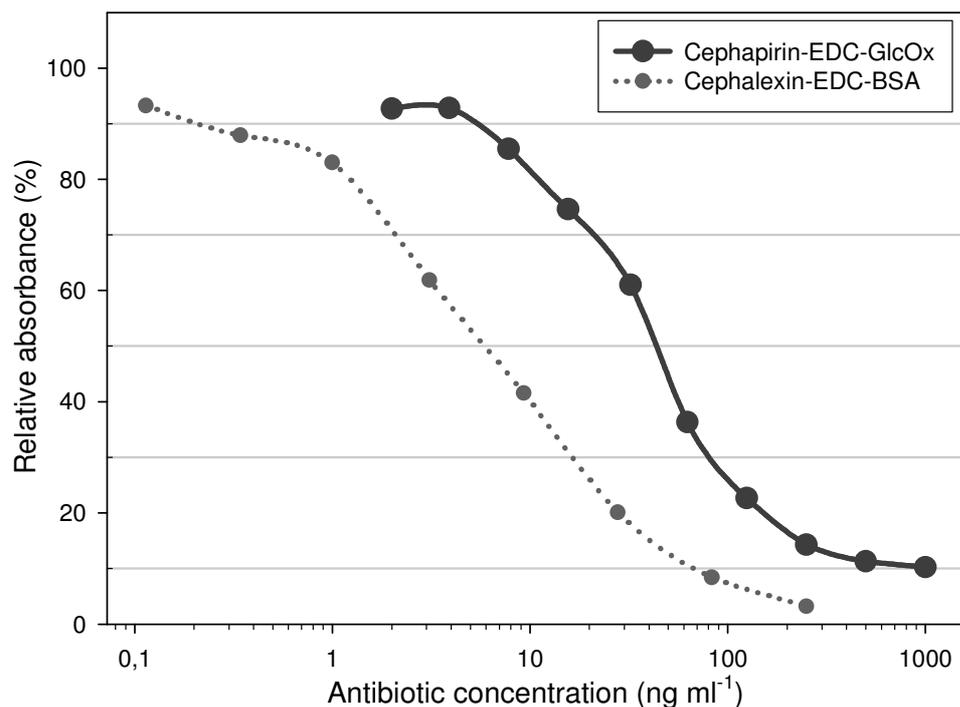
Under optimized indirect EIA conditions, the working ranges of the standard curves in buffer solutions were between 10.6 and 105 ng mL<sup>-1</sup> for cefoperazone (Fig. 2), 0.3 and 2 ng mL<sup>-1</sup> for ceftiofur (Fig. 3), 0.4 and 8 ng mL<sup>-1</sup> for cefquinome (see Electronic Supplementary Material Fig. S1), 2.7 and 38 ng mL<sup>-1</sup> for cephalixin and 17.2 and 250 ng mL<sup>-1</sup> for cephalirin (see Electronic Supplementary Material Fig. S2).



**Fig. 3** Standard curves for the detection of ceftiofur using the four different mAbs in an indirect competitive EIA coated with ceftizoxime-NHS-BSA. The coefficients of variation for replicate standard concentrations were typically below 8.3%



**Fig. S1** Standard curves for the detection of cefquinome using the four different mAbs in an indirect competitive EIA coated with cefquinome-NHS-BSA. The coefficients of variation for replicate standard concentrations were typically below 9.4%



**Fig. S2** Standard curves for the detection of cephalaxin and cephapirin, using mAb 1F10 and 2F10, respectively, in an indirect competitive EIA coated with the accordant EDC-conjugate. The coefficients of variation for replicate standard concentrations were typically below 6.0% for cephalaxin-coating and below 7.6% for cephapirin-coating, respectively

A comparison of our results with previously published methods for cefquinome, ceftiofur/desfuroylceftiofur and cephalaxin reveals that our mAb-based EIAs are at least similar or even better in sensitivity. Most data are available for cephalaxin, and reported  $IC_{50}$  values range from 0.6 to 6  $ng\ mL^{-1}$  [24,26,29,37]. Based on mAbs against desfuroylceftiofur, Rose et al. [30] established an EIA for the detection of ceftiofur, the  $IC_{50}$  value was at 0.33  $ng\ mL^{-1}$ . The  $IC_{50}$  value of an EIA for the detection of cefquinome, recently described by Thal et al. [31], was at 8  $ng\ mL^{-1}$ .

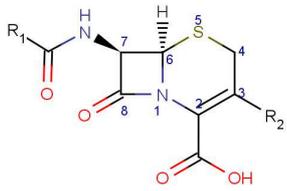
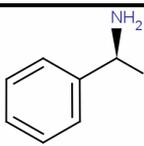
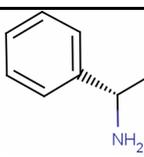
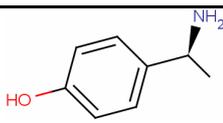
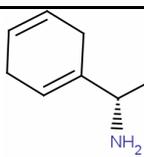
### Specificity

Considering the large number of beta-lactams approved for use in food-producing animals (“MRL compounds”), and the even larger number of beta-lactams which are only available in human medicine or as chemical standards (“non-MRL compounds”), the thorough characterization of the mAbs in aspects of specificity was a major task within this study. Specificity testing was performed by testing competitive binding inhibition of a set of 28 beta-lactam antibiotics, besides the target antigen, in the different assay formats. For most cephalosporins, more than one mAb was tested to ensure that in each final EIA, a clone

having optimal specificity pattern could be implemented. A focus was set on cephalosporins having at least some structural relationship with the target compounds. Furthermore, some penicillins sharing side chain residues with target cephalosporins were also included. Finally, testing of all beta-lactam antibiotics with defined MRL value was mandatory. To further characterize the mAb binding properties with regard to the cephem ring system of the cephalosporin haptens, the beta-lactam ring of MRL-regulated cephalosporins was cleaved by alkaline hydrolysis and the reactivity of the resulting, microbially inactive degradation products was tested in EIA.

The mAb against cephalixin showed cross-reactivity (Table 2) to the cephalosporins cefaclor and cephadroxil having, as the parent compound itself, an amino-benzyl-side chain. This reaction pattern is already known in allergology [38]. The least percentage of cross-reaction (9.7%) was detected for cefaclor, which has an identical chemical structure to cephalixin except that the methyl group at C-3 is replaced by chlorine. For cephradine, whose aromatic ring is partially hydrogenated and for cephadroxil containing a phenylglycyl side chain, mean cross-reactivities of 22.9% and 25.1%, respectively, were found (Table 2). Thus, the cephem nucleus together with the  $\alpha$ -amino group in the acyl side chain seems to be essential for antibody reactivity. This hypothesis is supported by the findings that alkaline hydrolyzed cephalixin (cleaved beta-lactam ring) showed only a very weak cross-reactivity of about 1% and that the penicillin analogues of cephalixin and cephadroxil, namely ampicillin and amoxicillin, did not react with the antibody (details not shown). Thus, the mAb showed cross-reactivities similar to the antibodies described by Meier [26] and Kachab et al. [23], albeit to a less extent. Recently, Chen et al. [29] described highly specific antibodies for cephalixin which showed, in contrast to our findings, no cross-reactivity with cefaclor. The other structurally related compounds, cephadroxil and cephradine, for which cross-reactivity is even more likely, were not tested in that study.

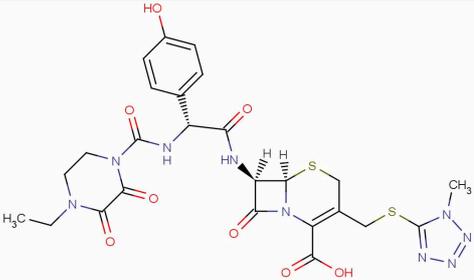
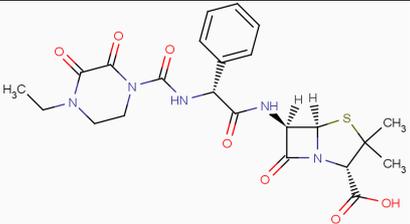
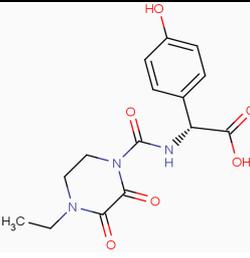
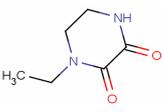
**Table 2** Structure-cross-reactivity relationship in the competitive indirect EIA formats for cephalixin using mAb 1F10 and either cephalixin-NHS-BSA or cephalixin-EDC-BSA as the coating antigen

Cephalosporin	Relative cross-reactivity (%) in EIA using coating antigen			
	Cephalixin-NHS-BSA	Cephalixin-EDC-BSA	R <sub>1</sub> =	R <sub>2</sub> =
Cephalixin (hydrolyzed)	100 (0.97)	100 (1.80)		-CH <sub>3</sub>
Cefaclor	9.62	9.72		-Cl
Cephadroxil	17.1	33.1		-CH <sub>3</sub>
Cephradine	16.9	29.0		-CH <sub>3</sub>

Relative cross-reactivity of all other tested beta-lactam antibiotics as listed under reagents and buffers and of 7-ACA was <1%

In our study, the only antibody which showed cross-reactivity with a penicillin was the mAb against cefoperazone. Considerable cross-reactivities (240.5%) for the acylamino-penicillin piperacillin (Table 3), representing the penam analogue of cefoperazone, were found. Detailed specificity studies revealed that EPB, representing the C-7 substituent of the cephem nucleus, forms together with the intact beta-lactam ring the immunodominant epitope for this antibody. As a consequence, after alkaline hydrolysis of cefoperazone, no reactivity of the resulting degradation products was observed. The importance of the C-7 side chain for antibody binding is underlined by the finding that cephalosporins such as cefmenoxime having an identical side-chain (*N*-methyl-thiotetrazole) at the C-3 position as cefoperazone are not recognized by the mAb 2G1.

**Table 3** Structure-cross-reactivity relationship in the EIA formats for cefoperazone using mAb 2G1 and either cefoperazone-NHS-BSA or cefoperazone-EDC-GlcOx as the coating antigen in competitive indirect test systems

Compound	Relative cross-reactivity (%) in EIA using conjugate			
	Cefoperazone-NHS-BSA	Cefoperazone-EDC-GlcOx	EPB-EDC-HRP	
Cefoperazone (hydrolyzed)	100 (< 0.35)	100 (< 0.39)	100 (< 0.13)	
Piperacillin	215	265	242	
EPB	13.8	15.2	15.2	
1-Ethyl-piperazin-2,3-dione	< 0.10	0.04	< 0.02	

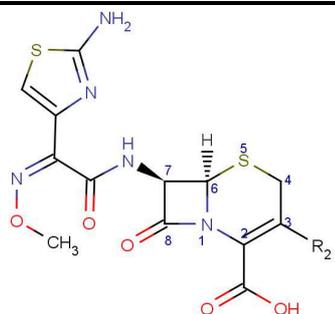
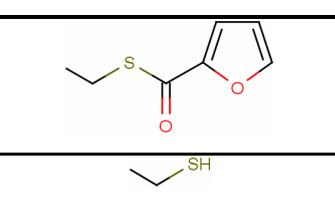
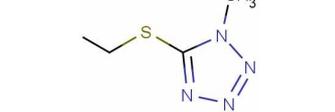
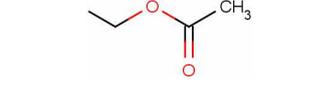
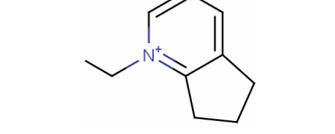
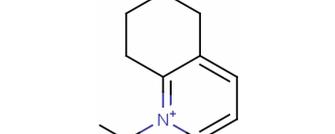
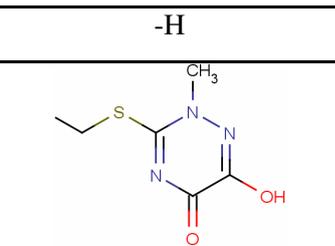
The results obtained for the same mAb in a competitive direct EIA with EPB-EDC-HRP as the labelled antigen are given for comparison purposes. Relative cross-reactivity of all other tested beta-lactam antibiotics as listed under reagents and buffers and of 7-ACA was <1%

Similarly, the C-7 substituent of cephalirin is essential for the reactivity of the respective antibody. This cephalosporin contains a rather unique pyridinylthioacetylated side chain which explains that none of the other tested cephalosporins showed measurable cross-reactions with the cephalirin-specific mAb 2F10. The importance of this side chain for the antibody binding is underlined by the fact that both the parent compound and the hydrolyzed form of cephalirin reacted equally with the mAb. Thus it can be anticipated

that the mAb also has high affinities for the 3-hydroxymethyl derivatives of cephapirin which are formed in vivo by esterases and persist even longer in milk than the parent compound [39]. Therefore the sum of cephapirin and desacetylcephapirin is defined as marker residue [10]. However, it was not possible to determine the exact cross-reactivity of this compound with the produced mAb since certified standards of desacetylcephapirin are currently not available.

Similarly an MRL for the sum of ceftiofur and desfuroylceftiofur in milk of  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  has been set. Desfuroylceftiofur, an active metabolite, of ceftiofur having the intact beta-lactam ring, possesses antimicrobial activity and is formed in animal tissues due to enzyme-catalysed hydrolysis of the thioester bond [36,40-41]. As mentioned above, to provoke antibodies reactive both with the parent compound and the desfuroyl metabolite an alternative approach was pursued. Analysing the specificity of the resulting antibodies partly confirmed the applied strategy. Interestingly, all mAbs exhibited higher affinities for ceftiofur than for ceftizoxime which was used as antigen. These findings indicate that the coupling bridge may simulate a second substituent on the cephem nucleus and thus determine the reactivity of the antibodies. In principle, according to their reaction profile, the mAbs reactive with ceftiofur could be divided in two groups. While the mAbs 1D7 and 1H7 showed only minor cross-reactivities with desfuroylceftiofur and hydrolyzed ceftiofur, the mAbs 2G4 and 2H6 exhibited marked cross-reactivities with all tested cephalosporins possessing both an aminothiazolyl ring fragment and an iminomethoxy group in the C-7 side chain (Table 4). Determined cross-reactivities varied from 2.3% to 133%. Differences may be explained by variations in the three-dimensional structure and surface charge of the individual haptens due to the highly variable side chains on the C-3 position of the cephem nucleus. Other cephalosporins lacking the thiazolyl ring fragment and all tested penicillins did not show competitive binding inhibition in the EIAs. Overall, the reactivity pattern of mAb 2H6 is very similar to a previously described mAb against desfuroylceftiofur [30]. Recently, polyclonal antibodies for the detection of ceftiofur have been described by Meier [26] utilizing the free amino group of the thiazolyl ring for conjugation. As a consequence, the antibodies were highly specific for ceftiofur, cross-reactivities with desfuroylceftiofur were marginal.

**Table 4** Structure-cross-reactivity relationship in the competitive indirect EIA formats for ceftiofur/desfuroylceftiofur using four different anti-ceftiofur mAbs and ceftizoxime-NHS-BSA as the coating antigen in competitive indirect EIAs

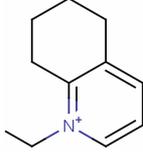
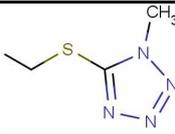
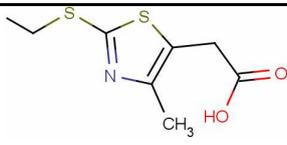
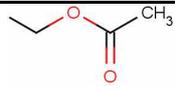
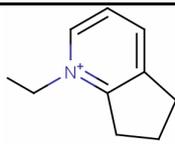
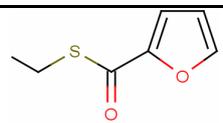
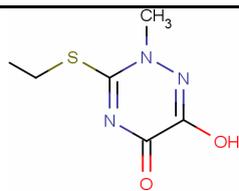
Cephalosporin	Relative cross-reactivity (%) in EIA using mAb				R <sub>2</sub> =
	1D7	1H7	2G4	2H6	
Ceftiofur (hydrolyzed)	100 (2.00)	100 (4.2)	100 (64.9)	100 (29.4)	
Desfuroylceftiofur	10.0	8.69	35.6	34.9	
Cefmenoxime	59.2	47.8	133	111	
Cefodizime	93.2	90.4	95.2	115	
Cefotaxime	6.55	2.25	55.5	36.0	
Cefpirome	11.3	16.2	34.0	50.5	
Cefquinome	3.42	3.82	17.7	21.9	
Ceftizoxime	9.72	2.31	30.7	15.6	-H
Ceftriaxone	23.9	82.8	64.9	54.0	

Relative cross-reactivity of all other tested beta-lactam antibiotics as listed under reagents and buffers and of 7-ACA was <1%

Not unexpectedly, some of the mAbs against cefquinome, represented by mAb 2E6 in Table 5, showed similar cross-reactivities as mAb 2G4 against ceftiofur. Interestingly, mAb 2E6 exhibits even higher affinities for all cross-reactive cephalosporins than for the parent compound cefquinome indicating that the three-dimensional structure and surface charge of the hapten was highly conserved during the preparation of the immunogen. In contrast, the highly specific mAb 3G9 reacted exclusively with cefquinome and ceftiofur which both have a quaternary ammonium side chain attached to the C-3 position of the beta-lactam nucleus. Thus, for the two types of antibodies against cefquinome either the C-7 or the C-3 side chains represent the immunodominant structure of the molecule. Moreover, analysis of hydrolyzed cefquinome confirmed that besides the side chains an intact beta-lactam ring is essential for antibody binding, particularly of the mAb 3G9. Thus, properties of the mAb 3G9 resemble that of a recently described rabbit antiserum against cefquinome [31]. In this study, the used immunogen was prepared by an alternative route, namely glutaraldehyde condensation.

Summarizing the results of the specificity tests of the five series of anti-cephalosporin mAbs, the side chain composition of the cephalosporins used for the immunization process determine the antibody binding, while presence of the intact cephem nucleus is necessary but not sufficient. This is underlined by the finding that none of the tested mAbs showed a measurable cross-reactivity with 7-ACA. As all antibiotics were attached to the protein via the carboxyl group of the beta-lactam nucleus, the substituent at C-7, which is more distal to the coupling site than that on C-3, mainly dictates antibody specificity. With regard to the limited number of cephalosporins approved for the treatment of milk-producing animals, four of the five EIAs reported here, namely the tests for cefoperazone, cefquinome, cephalexin and cephalixin, can be regarded as substance selective. The EIA for ceftiofur has strong cross-reactivities with cefquinome. Therefore, test samples giving a positive result in this EIA must be further analysed in the selective cefquinome EIA to elucidate the identity of the residue. The EIA for ceftiofur, however, has the advantage that it has strong cross-reactivity with the marker residue desfuroylceftiofur.

**Table 5** Structure-cross-reactivity relationship in the competitive indirect EIA formats for cefquinome using two different anti-cefquinome mAbs and cefquinome-NHS-BSA as the coating antigen in competitive indirect EIAs

Cephalosporin	Relative cross-reactivity (%) in EIA using mAb		R2 =
	2E6	3G9	
Cefquinome	100	100	
(hydrolyzed)	(4.20)	(< 0.02)	
Cefmenoxime	204	< 0.01	
Cefodizime	350	< 0.01	
Cefotaxime	218	< 0.01	
Cefpirome	116	82.5	
Ceftiofur	185	< 0.01	
Desfuroylceftiofur	132	< 0.01	
Ceftizoxime	288	< 0.01	-H
Ceftriaxone	901	< 0.01	

Relative cross-reactivity of all other tested beta-lactam antibiotics as listed under reagents and buffers and of 7-ACA was <1%

### Applicability of the mAb-based EIAs for the determination of cephalosporins in milk

With the availability of suitable EIA systems for cephalosporins, a simple, rapid and convenient protocol for residue analysis in milk samples could be established. To compensate for sample matrix effects on antibody-cephalosporin binding, cephalosporin standard solutions were prepared either in UHT milk or in reconstituted skim milk powder (100 g L<sup>-1</sup>). The cephalosporin standard curves prepared in these solutions were very similar to those prepared in buffer solution in aspects of IC<sub>50</sub> and IC<sub>30</sub> levels (Table 1 vs. Table 6). Selection of the mAb for the analysis of cefquinome (mAb 3G9) was made according to its specificity pattern, the mAb for ceftiofur (mAb 2H6) was selected because it had shown the highest standard curve robustness in preliminary analyses (data not shown). For the other tests, each one mAb with superior test properties was available (Table 1).

**Table 6** Test parameters of the optimized indirect EIA systems for the determination of cephalosporins in milk

Analyte	mAb (ng mL <sup>-1</sup> )	Solid phase antigen	Standard solutions prepared in	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )
Cefoperazone	2G1 (420)	Cefoperazone- EDC-GlcOx	UHT milk	11.8	27.2
Cefquinome	3G9 (60)	Cefquinome- EDC/NHS-BSA	skim milk	0.90	2.60
Ceftiofur	2H6 (60)	Ceftizoxime- EDC/NHS-BSA	skim milk	0.90	2.10
Cephalexin	1F10 (12)	Cephalexin- EDC/NHS-BSA	skim milk	4.20	17.7
Cephapirin	2F10 (5)	Cephapirin-EDC- GlcOx	UHT milk	19.4	43.5

The mean absorption of the antigen-free control was typically between 0.9 – 1.2

For all five tests, the detection limit for the individual cephalosporins under study in milk was well below the respective MRL value (Table 6). The assays for cefquinome and ceftiofur had the highest sensitivity, with a LOD of 0.9 ng mL<sup>-1</sup>. However, even the EIA with the lowest sensitivity (cephapirin, LOD 19.4 ng mL<sup>-1</sup>) could detect its target compound at levels which are three times lower than the MRL. In general the LODs in

milk of the EIAs described here are comparable with previously described immunoassays for ceftiofur, cefquinome and cephalixin [26,29,31,37].

As the MRL represents the level of interest for screening assays, the applicability of the developed EIAs was tested by analysing artificially contaminated milk samples containing the individual cephalosporins at concentrations enframing this value ( $0.5 \times \text{MRL}$ ,  $1 \times \text{MRL}$  and  $2 \times \text{MRL}$ ). The results (Table 7) show that each of the analyte could be reliably detected at the MRL, with coefficients of variation around 10–15% in most cases. Recovery studies for the desfuroyl-metabolite of ceftiofur have not been performed due to the limited availability of this standard. In general, recoveries were high, at 100–110% in most cases. This may be attributed to the minimal sample pre-treatment which consisted of defatting and direct analysis of the skimmed milk.

**Table 7** Recovery of cephalosporin antibiotics from artificially contaminated milk samples as determined by specific EIA system (SD = standard deviation; CV = coefficient of variation; n = 5)

Analyte (MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Added ( $\text{ng ml}^{-1}$ )	Found			
		Mean ( $\text{ng ml}^{-1}$ )	SD ( $\text{ng ml}^{-1}$ )	CV (%)	Recovery (%)
Cefoperazone (50)	25	29.9	3.60	12.1	120
	50	52.1	6.60	12.2	104
	100	101	11.4	11.3	101
Cefquinome (20)	10	11.3	1.60	13.8	113
	20	21.0	2.90	13.9	105
	40	38.3	5.70	15.0	95.6
Ceftiofur (100)	50	45.0	6.00	13.4	90.1
	100	92.9	6.70	7.20	92.9
	200	194	16.3	8.40	97.1
Cephalexin (100)	50	56.5	7.30	13.0	113
	100	113	17.6	15.6	113
	200	225	26.0	11.6	112
Cephapirin (60)	30	32.1	4.80	14.9	107
	60	59.3	7.70	13.0	98.9
	120	118	11.0	9.30	98.4

## Conclusions

A simple, efficient and rapid method for the synthesis of cephalosporin protein conjugates serving either as immunogens or coating antigens for EIA development was established. The generic applicability of this approach was demonstrated by the successful development of mAbs against ceftiofur and cephalexin as well as, reported here for the first time, against cefoperazone, cefquinome and cephapirin. All mAbs were able to detect the target antigens far below the relevant MRL concentrations. Specificity studies revealed that binding of the antibodies was mainly determined by one of the two side chains of the cephem nucleus, particularly by that at the C-7 position, which is more distal to the coupling site than that at C-3. The applicability of the EIA systems for the detection of cefoperazone, cefquinome, ceftiofur, cephalexin and cephapirin in milk was demonstrated. The integration of these assays in an automated immunosensor enabling the multiplexed analysis of residues would allow, in combination with penicillin-specific antibodies, the rapid, selective and quantitative detection of beta-lactam antibiotics in milk at the dairy level, independent from sophisticated physico-chemical methods. Further work will concentrate both on the applicability of the cephalosporin assays for the analysis of other food commodities and the development of further antibodies, particularly against cefazolin, to complete the panel of immunoassays for the detection of currently applied, MRL-regulated cephalosporins.

## Acknowledgements

This research project was partly supported by the Bavarian State Ministry of Nutrition, Agriculture and Forestry. We thank Ms. Brunhilde Minich, Ms. Franziska Witzko and Mr. Mostefa Djeflal for their excellent technical assistance.

## References

1. Hornish RE, Kotarski SF (2002) Cephalosporins in veterinary medicine: ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2:717-731
2. Rolinson GN, Geddes AM (2007) The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Int J Antimicrob Agents* 29:3-8
3. Mason IS, Kietzmann M (1999) Cephalosporins - pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. *Vet Dermatol* 10:187-192
4. Collignon P, Aarestrup FM (2007) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, food, and cephalosporin use in food animals. *Clin Infect Dis* 44:1391-1392

5. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J Food Prot* 61:742-756
6. Boisseau J (1993) Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. *Vet Microbiol* 35:187-192
7. Kirst E (2009) Rückstandsbestimmung in Kuhmilch gestern und heute. *Prakt Tierarzt* 90:356-362
8. Dewdney JM, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschueren C (1991) Risk assessment of antibiotic residues of [beta]-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem Toxicol* 29:477-483
9. Griffiths MW (2010) In: Griffiths MW (ed) *Improving the safety and quality of milk, volume 1: milk production and processing*, 1st edn. Woodhead Publ, Cambridge
10. European Commission (2010) Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Communities L* 15:1-72
11. Holstege DM, Puschner B, Whitehead G, Galey FD (2002) Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 50:406-411
12. Kantiani L, Farre M, Grases IFJM, Barcelo D (2010) Determination of antibacterials in animal feed by pressurized liquid extraction followed by online purification and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 398:1195-1205
13. Becker M, Zittlau E, Petz M (2004) Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 520:19-32
14. Bruno F, Curini R, di Corcia A, Nazzari M, Samperi R (2001) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. *J Agric Food Chem* 49:3463-3470
15. Daeseleire E, De Ruyck H, Van Renterghem R (2000) Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1404-1409
16. Cacciatore G, Petz M, Rachid S, Hakenbeck R, Bergwerff AA (2004) Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x. *Anal Chim Acta* 520:105-115
17. Lamar J, Petz M (2007) Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Anal Chim Acta* 586:296-303

18. Gustavsson E, Bjurling P, Degelaen J, Sternesjo A (2002) Analysis of beta-lactam antibiotics using a microbial receptor protein-based biosensor assay. *Food Agric Immunol* 14:121-131
19. Reybroeck W, Ooghe S, De Brabander HF, Daeseleire E (2010) Validation of the beta-s.t.a.r. 1+1 for rapid screening of residues of beta-lactam antibiotics in milk. *Food Addit Contam Part A-Chem* 27:1084-1095
20. Abouzied M, Sarzynski M, Walsh A, Wood H, Mozola M (2009) Validation study of a receptor-based lateral flow assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk. *J AOAC Int* 92:959-974
21. Sorensen LK, Snor LK (2000) Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 882:145-151
22. Kloth K, Rye-Johnsen M, Didier A, Dietrich R, Martlbauer E, Niessner R, Seidel M (2009) A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst* 134:1433-1439
23. Kachab EH, Wu WY, Chapman CB (1992) The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for cephalixin. *J Immunol Methods* 147:33-41
24. Xie H, Ma W, Liu L, Chen W, Peng C, Xu C, Wang L (2009) Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheids in milk. *Anal Chim Acta* 634:129-133
25. Meyer UJ, Zhi ZL, Loomans E, Spener F, Meusel M (1999) Automated stand-alone flow injection immunoanalysis system for the determination of cephalixin in milk. *Analyst* 124:1605-1610
26. Meier B (2008) Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Cefalexin, Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch. Diss med vet. Justus-Liebig-Universität Gießen
27. Dillon PP, Daly SJ, Browne JG, Manning BM, Loomans E, Van Amerongen A, O’Kennedy R (2003) Application of an immunosensor for the detection of the beta-lactam antibiotic, cephalixin. *Food Agric Immunol* 15:225-234
28. Nagakura N, Shimizu T, Masuzawa T, Yanagihara Y (1990) Anti-cephalexin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to cepheids and penams. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93:126-132
29. Chen LB, Wang ZF, Ferreri M, Su JL, Han B (2009) Cephalixin residue detection in milk and beef by ELISA and colloidal gold based one-step strip assay. *J Agric Food Chem* 57:4674-4679
30. Rose BG, Buckley SA, KampsHoltzapple C, Beier RC, Stanker LH (1996) Ceftiofur sodium: monoclonal antibody development and cross-reactivity studies with structurally related cephalosporins. *J Agric Food Chem* 44:622-627

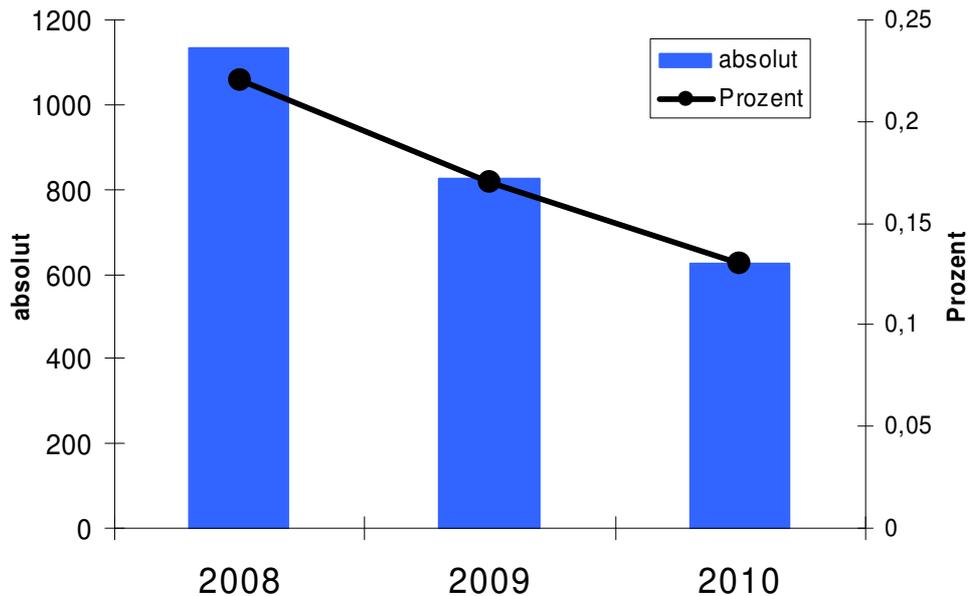
31. Thal J, Steffen M, Meier B, Schneider E, Adriany A, Usleber E (2011) Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment. *Anal Bioanal Chem* 399:1051-1059
32. Strasser A, Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E (2003) Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten–glucose oxidase conjugates. *Anal Chim Acta* 495:11-19
33. Grabarek Z, Gergely J (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* 185:131-135
34. Dietrich R, Usleber E, Martlbauer E (1998) The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins. *Analyst* 123:2749-2754
35. Farrell C, Rowell FJ, Dsilva C, Cumming RH (1994) Enzyme-linked-immunosorbent-assay for ceftazidime in airborne samples. *Analyst* 119:2411-2416
36. Rose BG, Kampsholtzapple C, Stanker LH (1995) Competitive indirect ELISA for ceftiofur sodium and the effect of different immunizing and coating antigen conjugates. *Bioconjug Chem* 6:529-535
37. Zhi ZL, Meyer UJ, Van den Bedem JW, Meusel M (2001) Evaluation of an automated and integrated flow-through immunoanalysis system for the rapid determination of cephalixin in raw milk. *Anal Chim Acta* 442:207-219
38. Trcka J, Seitz CS, Brocker EB, Gross GE, Trautmann A (2007) Aminopenicillin-induced exanthema allows treatment with certain cephalosporins or phenoxymethyl penicillin. *J Antimicrob Chemother* 60:107-111
39. Moats WA, Anderson KL, Rushing JE, Buckley S (2000) Conversion of cephalixin to deacetylcephalexin in milk and tissues of treated animals. *J Agric Food Chem* 48:498-502
40. Jaglan PS, Cox BL, Arnold TS, Kubicek MF, Stuart DJ, Gilbertson TJ (1990) Liquid chromatographic determination of desfuoylceftiofur metabolite of ceftiofur as residue in cattle plasma. *JAOAC* 73:26-30
41. Olson SC, Beconi-Barker MG, Smith EB, Martin RA, Vidmar TJ, Adams LD (1998) In vitro metabolism of ceftiofur in bovine tissues. *J Vet Pharmacol Ther* 21:112-120

## IV. DISKUSSION

Durch den therapeutischen Einsatz von Antibiotika bei Lebensmittel liefernden Tieren kommt es trotz gesetzlicher Regelungen immer wieder zu Rückständen in Lebensmitteln. Obwohl die Anzahl Hemmstoff-positiver Milchproben seit Beginn der Hemmstoff-Untersuchungen stark abgenommen hat, werden beispielsweise in Bayern trotzdem immer noch in ca. 0,1 – 0,2 % aller an die Molkereien gelieferten Betriebsmilch-Proben Hemmstoffe – wenn auch i. d. R. auf niedrigem Konzentrationsniveau – nachgewiesen (Milchprüfring Bayern e.V., 2010). Dieser zunächst niedrig erscheinende Prozentsatz an positiven Proben bedeutet aber, dass immer noch um die 1000 positive Proben im Jahr allein im Bundesland Bayern anfallen (Abb. 5).

Seit der Novelle des EU-Lebensmittelhygienerechts sind nicht mehr nur Untersuchungen im Rahmen der Milch-Güteverordnung auf Milchverarbeiter-Ebene vorgesehen, sondern es besteht auch zusätzlich gemäß VO (EG) Nr. 853/2004 eine Kontrollpflicht für Milcherzeuger, da diese rechtlich als Lebensmittel-Unternehmer gelten (Albrecht und Baumgartner, 2007). Ein geeignetes Verfahren um dieser Pflicht nachzukommen besteht z. B. in der systematischen Aufbewahrung der Untersuchungsergebnisse, die im Rahmen der Milchabrechnung anfallen (Landwirtschaftskammer NRW, 2012). Verknüpft mit der Untersuchungspflicht ist auch eine Meldepflicht an die Veterinärbehörde im Fall Hemmstoff-positiver Befunde. Durch Hofbegehungen soll sichergestellt werden, dass die rechtlich in VO (EG) Nr. 853/2004 geforderten Maßnahmen zur Vermeidung von Rückständen erfüllt werden und dass der Landwirt durch geeignete Maßnahmen Abhilfe schafft (Albrecht und Baumgartner, 2007). Die Aufklärung der Kontaminations-Ursache ist dabei auch für den Landwirt von Interesse, denn im Rahmen der sog. Cross-Compliance („Einhaltung der anderweitigen Verpflichtungen“) führen Verstöße gegen die Einhaltung des Lebensmittelhygiene-Pakets zu Konsequenzen bei Prämienzahlungen und EU-Fördermitteln.

Viele der zu diesem Zweck traditionell z. B. im Rahmen des integrierten Nachweisverfahrens eingesetzten mikrobiologischen Methoden und Schnelltests haben jedoch im Hinblick auf den Nachweis von Cephalosporinen verschiedene Nachteile. Zum einen werden einige Cephalosporine, v. a. Cefquinom (Tab. 5), nicht auf MRL-Niveau nachgewiesen. Zum anderen sind diese Tests z. B. beim mikrobiologischen Nachweis von Cefapirin (Tab. 5) oder beim Schnelltest auf Ceftiofur (Tab. 6) aber auch oft zu sensitiv.



**Abbildung 5:** Hemmstoffabzüge in Bayern im Jahresvergleich (Quelle: jeweilige Jahresauswertung des MPR Bayern)

Hier kommt es sogar bei Konzentrationen, die bis zu zehnfach unterhalb des MRL-Werts liegen, zu „falsch-positiven“ Ergebnissen. Diese ziehen wiederum für Molkereien und Milcherzeuger sehr kostenintensive Konsequenzen nach sich: um die Milch doch noch als „verkehrs-fähig“ einstufen zu können, müssen aufwändige und teure Bestätigungs-Untersuchungen durchgeführt werden, denn die Alternative bestünde in der unschädlichen Beseitigung der Milch gemäß VO (EG) Nr. 1774/2002.

Aus diesen Gründen und da  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu den am häufigsten nachgewiesenen Antibiotika in Milch gehören (Duelli, 2008; Krömker und Bruckmaier, 2007), ist der Nachweis von Rückständen dieser Substanzgruppe auf MRL-Niveau von besonderer Bedeutung. Um die beschriebene Lücke zwischen den bisher zur Verfügung stehenden Screeningverfahren und den im Bedarfsfall angewandten Bestätigungsverfahren zu schließen, stellt die Etablierung enzymimmunologischer Verfahren, die eine schnelle und einfache Durchführung sowie hohe Sensitivität und Spezifität mit der Möglichkeit zum qualitativen sowie quantitativen Nachweis kombinieren, eine sinnvolle Möglichkeit dar.

Die Gruppe der Cephalosporine kann aber mit substanzspezifischen Antikörpern – Voraussetzung für die Erstellung enzymimmunologischer Nachweisverfahren – bisher nur unzulänglich erfasst werden. Nur für drei (Cefalexin, Cefquinom und Ceftiofur) der acht Cephalosporine, die zur Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren zugelassen sind, wurden bislang poly- bzw. monoklonale Antikörper beschrieben (Tab. 7).

Um diese analytische Lücke zu schließen, sollten im Rahmen dieser Arbeit monoklonale Antikörper zum Nachweis der derzeit auf dem Markt befindlichen, für Lebensmittel liefernde Tiere zugelassene Cephalosporine entwickelt und darauf basierende EIA-Verfahren zum Nachweis dieser Rückstände in Milch etabliert werden.

## 1. Herstellung der Immunreagenzien

Niedermolekulare Substanzen, zu denen auch die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehören, sind *per se* nicht immunogen und müssen daher an Träger-Proteine gekoppelt werden, um eine Antikörperbildung hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurden in der Literatur verschiedenste Methoden vorgestellt, die jedoch größtenteils relativ aufwändig und zeitintensiv waren (Kachab et al., 1992; Nagakura et al., 1990; Wang et al., 2009). Ziel war es daher, basierend auf den Ergebnissen dieser Veröffentlichungen einfache, schnell durchführbare und gleichzeitig effiziente Kopplungsmethoden zur Herstellung von Immunreagenzien zu entwickeln, die universell bei Cephalosporinen einsetzbar sind.

Auf der Grundlage von früheren, sehr guten Erfahrungen (Dietrich et al., 1998; Thal et al., 2011) wurde das Trägerprotein KLH (keyhole limpet hemocyanin) für die Herstellung von Immunogenen verwendet und die Makromoleküle BSA (bovines Serumalbumin) bzw. Glucose-Oxidase (GlcOx) für die Synthese von Coating-Antigenen eingesetzt, die sowohl zum Antikörpernachweis in den Seren der immunisierten Mäuse als auch für die Etablierung und Optimierung indirekter Enzymimmuntests benötigt wurden. Als Kopplungs-Methoden kamen die auf den Kopplungs-Reagenzien EDC und NHS beruhende zweistufige „aktive-Ester-Methode“ („EDC/NHS“; Grabarek und Gergely, 1990) sowie die nur auf EDC basierende „Carbodiimid-Methode“ („EDC-only“; Goodfriend et al., 1964) zum Einsatz.

Die den Mäusen injizierten, mit dem nachzuweisenden Hapten (Cefalexin, Cefapirin bzw. Cefquinom) selbst hergestellten „EDC/NHS“-Protein-Konjugate erwiesen sich als hochimmunogen (Table S2). Eine Ausnahme bildete das Cefoperazon-KLH-Konjugat, das nur moderat immunogen wirkte. Hierbei konnten in den Seren erst nach einer Restimulierung höhere spezifische Antikörpertiter von  $> 1:20.000$  nachgewiesen werden.

Eine ausgeprägte Immunantwort wurde insbesondere auch mit dem zur Gewinnung von Antikörpern gegen Ceftiofur eingesetzten Hapten-heterologen Ceftizoxim-KLH-Konjugat erhalten. Die in früheren Arbeiten (Meier, 2008; Rose et al., 1995) zur Gewinnung von Antikörpern gegen Ceftiofur eingesetzten Ceftiofur-Protein-Konjugate erwiesen sich

hingegen als schlecht immunogen. Auch die in den früheren Studien beschriebene Problematik, dass die erhaltenen Antiseren keine oder nur vergleichsweise niedrige Kreuzreaktionen mit dem Ceftiofur-Metaboliten DFC zeigten, konnte mit dem jetzt genutzten innovativen Ansatz, bei dem Ceftizoxim, dem wie DFC im Vergleich zu Ceftiofur die C-3-Seitenkette fehlt, umgangen werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da in der VO (EU) 37/2010 als Markerrückstand für Ceftiofur die „Summe aller den  $\beta$ -Lactam-Ring enthaltenden und als DFC gemessenen Rückstände“ festgelegt wurde (2.2.).

Basierend auf den für die Herstellung von Cephalosporin-Konjugaten optimierten, schnellen und einfachen Kopplungsverfahren konnte eine breite Palette von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Cephalosporine, nämlich Cefalexin und Ceftiofur sowie erstmals auch gegen Cefapirin, Cefoperazon und Cefquinom, produziert werden.

Einzig die Synthese eines Immunogens für die Induktion von Antikörpern gegen Cefazolin war mit den entwickelten Verfahren bisher nicht erfolgreich. Die polyklonalen Mausantiseren waren zwar in der Lage, an verschiedene Cefazolin-Beschichtungs-Konjugate zu binden, eine Hemmung der Bindung an das markierte Antigen durch Zugabe von freiem Cefazolin konnte jedoch nicht gezeigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Gründe hierfür sind unklar, möglicherweise kommt es unter den verwendeten Kopplungsbedingungen zu einer Nebenreaktion mit dem Tetrazolyl-Substituenten (Teil der C-7-Seitenkette) dieses Cephalosporins. Diese Problematik ließe sich eventuell umgehen, wenn zur Herstellung des Immunogens als Hapten 7-ACS mit angelagertem C-3-Substituenten des Cefazolins (Thiadiazol) eingesetzt wird. Da entsprechende Cefazolin-Strukturanaloga kommerziell nicht erhältlich sind, wurde im Hinblick auf den hohen Synthese-Aufwand dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt.

## **2. Etablierung von Enzymimmuntests**

Da niedermolekulare Substanzen wie Cephalosporine nur mit kompetitiven enzymimmunologischen Nachweisverfahren zu erfassen sind, wurden verschiedene auf diesem Testformat basierende, meist indirekte EIA-Verfahren entwickelt. Während der Validierung wurde besonderes Augenmerk auf Sensitivität und Spezifität der Tests gelegt.

### **2.1. Sensitivität**

Zur Optimierung der EIA-Verfahren wurden mittels Schachbretttitration die optimalen Immunreagenzien-Konzentrationen ermittelt, wobei insbesondere der Einfluss heterologer Antigen-Protein-Konjugate auf die Sensitivität des Testverfahrens überprüft wurde.

Die nach den Vorversuchen zur näheren Charakterisierung ausgewählten Klone wurden zunächst mit homolog zum Immunogen hergestellten Beschichtungskonjugaten in indirekten EIAs getestet. Hierbei zeigte sich, dass prinzipiell mit den generierten mAk unter diesen EIA-Bedingungen alle untersuchten Cephalosporine – Cefalexin, Cefapirin, Cefoperazon, Cefquinom und Ceftiofur – auf MRL-Niveau nachgewiesen werden können; die Nachweisgrenzen lagen im Bereich von 0,3 (Ceftiofur) bis 23,4 ng/ml (Cefapirin). Um jedoch insbesondere beim Cefapirin und Cefoperazon-Nachweis einen größeren analytischen Spielraum zwischen MRL und Sensitivität des Testverfahrens zu erhalten, wurden weitere alternativ hergestellte Enzym- bzw. Protein-Konjugate getestet. Hierbei resultierte der Einsatz der mit der Carbodiimid-Methode („EDC-only“) hergestellten Beschichtungsantigene in den EIAs zum Nachweis von Cefalexin, Cefapirin und Cefoperazon in einer deutlichen Verbesserung der EIA-Sensitivität um etwa Faktor 1,5. Dies war insofern etwas überraschend, da beide gewählten Kopplungsvarianten den gleichen „zero-length-crosslinker“ verwenden, so dass theoretisch identische Konjugate entstehen sollten. Andererseits treten im Vergleich zur zielgerichteten Kopplung an die Carboxylgruppe des Cephem-Rings mittels „EDC/NHS“-Methode (Chen et al., 2009; Dillon et al., 2003) beim „EDC-only“-Verfahren zum einen mehr Nebenreaktionen auf (Meier, 2008; Nolli und Parenti, 1991; Thermo Fisher Scientific Inc., 2012) und zum anderen wurden bei diesem Ansatz auch deutlich längere Reaktionszeiten (24 anstatt 2,33 Stunden) verwendet, was in Anbetracht der bekannten Instabilität von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in wässrigen Lösungen (Deshpande et al., 2004; Hou und Poole, 1971) zu einer gewissen Denaturierung der Cephalosporine geführt haben könnte. Beide Möglichkeiten beeinflussen sicher die Affinität der spezifischen Antikörper zum markierten Antigen und somit auch die Sensitivität des EIA-Testsystems.

Unter optimierten EIA-Bedingungen lagen die Nachweisgrenzen für die verschiedenen Cephalosporine bei 0,3 ng/ml (Ceftiofur, mAk 1D7 + Ceftizoxim-EDC/NHS-BSA), 0,4 ng/ml (Cefquinom, mAk 3G9 + Cefquinom-EDC/NHS-BSA), 1,1 ng/ml (Cefalexin, mAk 1F10 + Cefalexin-EDC-HRP), 6,1 ng/ml (Cefoperazon, mAk 2G1 + EPB-EDC-HRP) sowie 17,2 ng/ml (Cefapirin, mAk 2F10 + Cefapirin-EDC-GlcOx). Die Sensitivität der Antikörper zum Nachweis von Cefalexin, Cefquinom und Ceftiofur ist mit denen in anderen Arbeiten beschriebenen Testempfindlichkeiten vergleichbar (Meier, 2008; Meyer et al., 1999; Stanker et al., 1998; Thal et al., 2011; Xie et al., 2009; Zhi et al., 2001).

Trotz der Verbesserung der Sensitivität des EIA zum Nachweis von Cefapirin bei Einsatz eines heterologen Protein-Beschichtungskonjugats lag die Nachweisgrenze (17,2 ng/ml)

nur knapp unter dem von der FDA (Food and Drug Administration) für die USA festgelegten „Tolerance-Level“ von 20 ppb. Deswegen wurde in weiteren Versuchen kryokonserviertes Zellmaterial aus der „Cefapirin-Zellfusion“ aufgetaut und auf alternative Hybridom-Zelllinien gescreent (Ergebnisse nicht dargestellt). In diesen nach Einreichung der Publikation durchgeführten Versuchen konnten vier weitere mAk gegen Cefapirin etabliert werden (Tab. 9), die z. T. eine deutlich höhere Affinität für freies Cefapirin aufwiesen als der in der ersten Versuchsreihe etablierte mAk 2F10. Insbesondere der mAk 4A8 ermöglicht den sensitiven Nachweis von Cefapirin, die 50 %-Dosis von 6,6 ng/ml liegt deutlich unter dem europäischen MRL-Wert von 60 ng/ml bzw. dem US-amerikanischen Tolerance-Level von 20 ppb.

**Tabelle 9:** Sensitivitäts-Vergleich des bereits publizierten Cefapirin-mAk 2F10 mit den nachträglich aus kryokonserviertem Zellmaterial hergestellten mAks

MAk	Verdünnung mAk <sup>1</sup>	Konzentration (ng/ml) des Coating-Antigen <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	LOD (ng/ml)
<b>2F10</b>	1:16000	40	40,3	17,2
<b>3D4</b>	1:4000	125	14,4	7,4
<b>4H9</b>	1:180	250	19,6	7,9
<b>4A8</b>	1:6000	125	6,6	3,1
<b>3D7</b>	1:2000	250	40,4	15,4

<sup>1)</sup> eingesetzt wurden Zellkultur-Überstände

<sup>2)</sup> Cefapirin-EDC-GlcOx

Die oftmals berichtete deutliche Sensitivitäts-Steigerung durch Verwendung heterologer Haptene (Holthues et al., 2005; Kim et al., 2003; Tagawa et al., 2000; Van Weemen und Schuurs, 1975) wurde beim Cefquinom-Nachweis anhand eines Cefpirom-EDC/NHS-BSA-Konjugats überprüft; die IC<sub>50</sub>-Werte zeigten jedoch nur eine geringfügige Verbesserung von 1,8 auf 1,2 ng/ml. Bei sehr hochaffinen Antikörpern ist es allerdings aufgrund der grundlegenden Prinzipien kompetitiver EIA-Systeme bekanntermaßen schwierig, mit der Verwendung heterologer Hapten-Konjugate eine weitere Verbesserung der Sensitivität zu erzielen (Märtlbauer, 1993).

Der Einsatz eines „fragment derived“-Konjugats hingegen, wie es z. B. von Franek et al. (2006) für Sulfonamide oder von Loomans et al. (2003) für Aminoglykoside beschrieben wurde, kam beim Cefoperazon-Nachweis erfolgreich zum Einsatz. Da die

außergewöhnlich hohe Kreuzreaktivität des mAk 2G1 von durchschnittlich 240 % zum Cefoperazon-Penam-Analog Piperacillin belegt, dass das der C-7-Seitenkette des Cephalosporins entsprechende EPB ein wichtiges Epitop darstellt, wurde dieser Substituent als Hapten-Fragment ausgewählt und mit der Carbodiimid-Methode an das Enzym HRP gekoppelt. Die Verwendung dieses Konjugats resultierte im direkten EIA-Format in einer nochmaligen Verbesserung der Sensitivität um den Faktor 1,5 im Vergleich zum mit der gleichen Kopplungs-Methode hergestellten, im indirekten EIA verwendeten Konjugat.

Eine ähnliche Steigerung der Sensitivität in einem direkten EIA zum Nachweis von Cefalexin, für den ein Cefalexin-EDC-HRP-Konjugat hergestellt wurde, lässt auch ein gewisses Potential zur Sensitivitäts-Steigerung durch direkte EIA-Formate vermuten (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die direkten Formate jedoch keine wesentlichen Vorteile für die Verbesserung der Sensitivität hatten und indirekte EIA-Formate im Hinblick auf die Testdurchführung Vorteile – z. B. die Verwendung eines standardisierten, kommerziell erhältlichen, enzymmarkierten Sekundär-Antikörpers, der aufgrund der konsekutiven Inkubation nicht mit der Probe und deren Matrix in Kontakt kommt – bieten, wurden die direkten EIA-Varianten für die Anwendung mit Milch nicht weiter validiert. Hierbei spielte auch eine Rolle, dass die EIA-Verfahren mittelfristig auf das von Kloth et al. (2009) beschriebene Biosensor-Format, das ebenfalls auf dem Prinzip eines indirekt kompetitiven Immunoassays beruht, implementiert werden sollten.

## **2.2. Spezifität**

Die Selektivität immunchemischer Nachweisverfahren wird durch die Spezifität des verwendeten Antikörpers bestimmt. Zur umfangreichen Charakterisierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu generierten mAk zum Nachweis von Cefalexin, Cefapirin, Cefoperazon, Cefquinom und Ceftiofur wurden daher auch im Hinblick auf die Vielzahl der als Therapeutika in der Human- und Veterinärmedizin sowie als chemische Standards verfügbaren Cephalosporine eine breite Palette von 33 strukturell unterschiedlichen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika für die Untersuchungen zur Spezifität eingesetzt.

Die umfangreichen Untersuchungen zur Spezifität zeigten, dass keiner der generierten mAks die Eigenschaften eines sog. generischen Antikörpers, der durch eine breite Kreuzreaktivität innerhalb der Gruppe der Cephalosporine charakterisiert wäre, aufwies. Antikörper mit solchen Eigenschaften wurden z. B. für die  $\beta$ -Lactam-Untergruppe der Penicilline und auch für Sulfonamide beschrieben, als immundominantes Epitop wurde dabei das den jeweiligen Antibiotika-Gruppen gemeinsame Strukturmerkmal – 6-APS bei

den Penicillinen bzw. die p-Aminobenzolsulfonamid-Gruppe bei den Sulfonamiden – identifiziert (Adrian et al., 2009; Cliquet et al., 2001; Franek et al., 2006; Haasnoot et al., 2000; Strasser et al., 2003; Usleber et al., 1998). Zur Herstellung der gruppenspezifischen Antikörper gegen Penicilline wurde als Immunogen ein Ampicillin-KLH-Konjugat verwendet, die Kopplung erfolgte über die freie Aminogruppe des  $\beta$ -Lactam Antibiotikums (Usleber et al., 1998). Verschiedene Versuche, diesen Ansatz auf den immunchemischen Nachweis von Cephalosporinen zu übertragen, führten hingegen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Meier (2008) verwendete das Cephalosporin-Analog von Ampicillin, nämlich Cefalexin, zur Herstellung eines Immunogens. Die resultierenden polyklonalen Kaninchenseren zeigten jedoch nur eine sehr begrenzte Reaktivität innerhalb der Cephalosporin-Gruppe, relevante Kreuzreaktionen wurden nur mit den strukturverwandten Wirkstoffen Cefaclor, Cefadroxil und Cephadrin beobachtet, die alle sehr ähnliche C-7-Substituenten aufweisen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass im Gegensatz zu Penicillinen, die nur eine Seitenkette am C-7-Atom der 6-APS besitzen (Tab. 1), bei Cephalosporinen die beiden hochvariablen Seitenketten an den C-7- und C-3-Atomen der 7-ACS die Produktion gruppenspezifischer Antikörper verhindern, da dadurch das Cephem-Grundgerüst sozusagen sterisch abgeschirmt wird.

Hingegen beschrieben Xie et al. (2009), die ein fast identisches Verfahren zur Herstellung des Cefalexin-Immunogens einsetzten, die Induktion gruppenspezifischer polyklonaler Antiseren gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bei Kaninchen. Das so gewonnene Antiserum zeigte ausgeprägte Kreuzreaktionen von 6 bis 46,5 % nicht nur mit strukturell unterschiedlichen Cephalosporinen wie Cefapirin, Cefazolin oder Ceftiofur, sondern sogar auch mit Penicillinen wie Ampicillin und Penicillin G. Überraschenderweise wurden hohe Kreuzreaktionen mit dem strukturell sehr unterschiedlichen Ceftiofur (36,6 %) festgestellt, während das Penam-Analog zum Cefalexin, Ampicillin nur eine geringe Kreuzreaktivität von 6 % zeigte. Da diese Ergebnisse jedoch bislang in keiner weiteren Studie reproduziert werden konnten, bleibt unklar, ob die berichtete Kreuzreaktivität nicht vielleicht auf Verunreinigungen in den verwendeten Standards zurückzuführen sein könnte. Auch in den eigenen Untersuchungen konnten bei Verwendung eines Cefalexin-Konjugates als Immunogen in den Seren der immunisierten Mäuse keine generischen Antikörper nachgewiesen werden. Ebenso zeigte der hergestellte mAk gegen Cefalexin ähnlich wie das von Meier (2008) beschriebene Kaninchenantiserum nur Kreuzreaktionen mit Cephalosporinen, die einen ähnlichen C-7-Substituenten besitzen.

Auch für die meisten anderen der hergestellten mAk gegen Cephalosporine erwies sich die

Seitenkette an C-7 als immundominantes Epitop. Dies war besonders ausgeprägt beim mAk gegen Cefoperazon, der deswegen als einziger der hergestellten Antikörper sehr hohe Kreuzreaktivitäten mit dem entsprechenden Penicillin-Analog, Piperacillin, aufwies. Die Relevanz dieser Seitenkette für die Antikörper-Reaktivität dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die jeweiligen C-7-Substituenten relativ weit von der zur Kopplung genutzten Carboxyl-Gruppe des Cephem-Grundgerüsts entfernt liegen, was die Induktion von entsprechenden Antikörpern begünstigt. Die einzige Ausnahme unter den hergestellten Antikörpern stellt hierbei der mAk 3G9 zum Nachweis von Cefquinom dar, bei dem ähnlich zu dem von Thal et al. (2011) beschriebenen Kaninchenantiserum die an C-3 substituierte quartäre Ammoniumverbindung die Reaktivität des Antikörpers bestimmt.

Während die gesetzlichen Bestimmungen in VO (EU) Nr. 37/2010 bei den meisten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika lediglich für die Substanz selbst einen MRL-Wert vorsehen, besteht bei den Cephalosporinen Cefapirin und Ceftiofur eine Besonderheit. Da diese Wirkstoffe einem Metabolismus im Körper unterliegen (1.5.3.), der dazu führt, dass auch antimikrobiell wirksame Abbauprodukte in Lebensmitteln auftreten, gilt deren MRL-Wert nicht nur für die Muttersubstanz, sondern auch für deren Metaboliten. Demzufolge sind Kreuzreaktionen der spezifischen Antikörper mit diesen Metaboliten Voraussetzung für die rückstandsanalytische Anwendbarkeit darauf basierender immunchemischer Verfahren zum Nachweis der beiden Cephalosporine in der Milch.

Ceftiofur wird unter den Cephalosporinen besonders gerne eingesetzt, da es eines der wenigen für milchproduzierende Rinder zugelassenen Antibiotika ohne Wartezeit (Tab. A 1, s. Anhang). Diese gilt jedoch nur bei fachgerechter Applikation (i. m. oder s. c.), denn nur so ist gewährleistet, dass durch die rasche Metabolisierung des Antibiotikums zu DFC nur sehr geringe Rückstände in der Milch nachzuweisen sind. Eine unsachgemäße intramammäre Anwendung hingegen führt zu Ceftiofur-Rückständen in Milch (Tyczkowska et al., 1993). Während alle vier getesteten Klone zum Ceftiofur-Nachweis die Muttersubstanz weit unterhalb des MRL-Werts von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nachweisen konnten, war deren Affinität zum Metaboliten DFC unterschiedlich hoch. Es ließen sich zwei Gruppen von Antikörpern unterscheiden: mAk 1D7 und 1H7 erkannten hauptsächlich Ceftiofur, während für DFC und das strukturverwandte Cephalosporin Cefquinom nur geringe Kreuzreaktionen von unter 10 % ermittelt wurden. Im Gegensatz hierzu zeigten die beiden anderen mAks 2G4 und 2H6 ausgeprägte Kreuzreaktionen (bis ca. 35 %) mit diesen Verbindungen.

Der Wirkstoff Cefapirin ist zum einen als intrauterin anzuwendendes Präparat zur Endometritis-Therapie, zum anderen - im Gegensatz zu Ceftiofur – aber auch für die intramammäre Anwendung als Trockensteller zugelassen (Tab. A 1, s. Anhang). Nach intramammärer Applikation wird es aufgrund seiner geringen Fettlöslichkeit nur wenig aus der Milch in die systemische Zirkulation absorbiert, jedoch partiell u. a. zum Hauptmetaboliten Desacetylcefapirin (DAC, Abb. 3) metabolisiert (Stockler et al., 2009) und persistiert in dieser Form sogar länger in der Milch als Cefapirin selbst (Moats et al., 2000). Da das Abbauprodukt nicht kommerziell erhältlich ist, konnte die Kreuzreaktivität des Cefapirin-mAk 2F10 mit dem Metaboliten DAC nicht experimentell bestimmt werden. Zu alkalisch hydrolysiertem Cefapirin allerdings bestand eine nahezu gleiche Affinität des Antikörpers wie zu Cefapirin selbst, was darauf schließen lässt, dass die Pyridinylthioacetyl-Seitenkette des Moleküls als antigene Determinante fungiert. Da diese natürlich auch in desacetyliertem Cefapirin (Abb. 3) vorhanden ist, ist davon auszugehen, dass der mAk auch mit dem Metaboliten DAC reagiert.

Abgesehen von der gewünschten Reaktivität beim Cefapirin- und Ceftiofur-Nachweis mit den entsprechenden Metaboliten traten Kreuzreaktionen der mAk i. d. R. nur mit solchen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auf, deren Einsatz beim Lebensmittel liefernden Tier verboten ist und bei denen daher auch keine Rückstände in Milch zu erwarten sind. Somit konnten im Hinblick auf die Anwendung im Lebensmittel für alle untersuchten Cephalosporine mAk etabliert werden, die den substanzspezifischen Nachweis der Verbindungen auf MRL-Niveau ermöglichen.

### **3. Anwendung der Enzymimmuntests**

Zur Überprüfung der Praxistauglichkeit der entwickelten EIA-Systeme wurde Kuhmilch mit unterschiedlichen Konzentrationen des nachzuweisenden Antibiotikums versetzt. Die Anforderungen an die Testsysteme waren durch den entsprechenden MRL-Wert (je nach Cephalosporin 20 – 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) vorgegeben; die Proben wurden zur Validierung mit Konzentrationen entsprechend dem  $\frac{1}{2}$ -, 1-, sowie 2-fachen des jeweiligen MRL-Werts dotiert. Zur Probenvorbereitung war lediglich eine Entfettung der Milchproben mittels Zentrifugation nötig. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 90 und 120 % (durchschnittlich 104 %) bei Variations-Koeffizienten von durchschnittlich 12,3 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch einen einfachen Entfettungsschritt unspezifische Einflüsse der Probenmatrix auf die Testsysteme – resultierend in falsch-positiven Befunden – fast vollständig vermieden werden konnten. Da zudem das Auftreten falsch-negativer EIA-

Ergebnisse prinzipiell aufgrund der kompetitiven Testanordnung als sehr unwahrscheinlich angesehen wird (Märtlbauer, 1993), ermöglichen die etablierten Testverfahren eine sichere, zuverlässige, reproduzierbare und quantitative Analytik fast aller relevanten Cephalosporine in Kuhmilch.

Kress (2010) beschreibt den enzymimmunologischen Penicillin-Nachweis in Ziegenmilch mittels eines gruppenspezifischen Antiserums gegen Penicilline, das von Strasser et al. (2003) ursprünglich zum Penicillin-Nachweis in Kuhmilch hergestellt wurde. Nach entsprechender Optimierung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen EIA-Systeme auf die entsprechenden Matrices wäre auch die Hemmstoff-Untersuchung von Milchen anderer Tierarten als weiteres Einsatzgebiet denkbar. Die Erweiterung der Anwendbarkeit vor allem auf Ziegenmilch wäre deshalb sinnvoll, da bei dieser Matrix mit den bestehenden mikrobiologischen Nachweisverfahren aufgrund der unspezifischen Wachstums-Inhibition des Testkeims durch milchoriginäre Hemmstoffe wie Lysozym oder Lactoferrin öfters falsch-positive Ergebnisse auftreten (Zeng et al., 1996). Auch der Einsatz der EIA-Verfahren zur rückstandsanalytischen Untersuchung von Fleisch bzw. Fleischerzeugnissen wäre durchaus vorstellbar, Voraussetzung hierfür ist allerdings die Entwicklung schneller und einfacher, mit dem Nachweisverfahren kompatibler Probenaufbereitungsverfahren.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten antikörperbasierten spezifischen Nachweisverfahren stehen nun erstmals einfache Methoden zur Verfügung, die fast alle der relevanten, derzeit in der Therapie von Lebensmittel liefernden Tieren eingesetzten Cephalosporine zuverlässig weit unter dem MRL-Wert nachweisen können. Um die Palette zu vervollständigen, wäre die Entwicklung weiterer mAk zum Nachweis von Cefazolin wünschenswert. Durch die Implementierung der hergestellten Antikörper in ein Multi-Analytfähiges Biosensor-System (Kloth et al., 2009) wird zukünftig die schnelle und kostengünstige Identifizierung und Quantifizierung von Cephalosporin-Rückständen in Milch unter Routinebedingungen ermöglicht werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern (mAk) zum Nachweis verschiedener relevanter Cephalosporin-Rückstände. Zu diesem Zweck wurden einfache, schnelle und effiziente Verfahren zur Synthese von Cephalosporin-Protein-Konjugaten entwickelt. Zur Gewinnung von Antikörpern wurden Mäuse mit den entsprechenden, mittels aktiver-Ester-Methode an Trägerproteine gekoppelten Cephalosporinen immunisiert. Mittels Zellfusion konnten verschiedene Hybridom-Zelllinien etabliert werden, die mAk zum Nachweis von Cefalexin und Ceftiofur sezernierten. Des Weiteren gelang es erstmals, auch mAk zum Nachweis von Cefapirin, Cefoperazon und Cefquinom herzustellen. Basierend auf diesen mAk wurden verschiedene, hauptsächlich indirekt kompetitive EIA-Verfahren entwickelt und für die Analyse von Milch optimiert.

Hinsichtlich der angestrebten Sensitivität waren die in der VO (EU) Nr. 37/2010 festgelegten Rückstandshöchstmengen (MRL-Werte) maßgeblich. Alle mAks waren in der Lage, ihr Ziel-Antibiotikum in Konzentrationen weit unterhalb des entsprechenden MRL-Werts nachzuweisen; die Nachweisgrenzen der optimierten EIA-Verfahren betrugen 0,3 ng/ml (Ceftiofur), 0,4 ng/ml (Cefquinom), 2,7 ng/ml (Cefalexin), 6,1 ng/ml (Cefoperazon) bzw. 17,2 ng/ml (Cefapirin) und lagen damit ca. 3,5- bis 330-fach unterhalb dem jeweiligen Grenzwert.

Die Spezifität der Antikörper wurde v. a. durch die C-7-Seitenkette des zur Immunisierung verwendeten Cephalosporins geprägt. Nachweisbare Kreuzreaktionen der mAks traten daher nur mit solchen Cephalosporinen auf, die einen strukturell verwandten C-7-Substituenten aufwiesen. Diese kreuzreaktiven Cephalosporine sind jedoch nicht zur Therapie Lebensmittel liefernder Tiere zugelassen. Mit Ausnahme von Ceftiofur ermöglichen die Antikörper daher den substanzspezifischen Nachweis von Cephalosporin-Rückständen in Lebensmitteln.

Die Anwendbarkeit der etablierten EIA-Verfahren zum Nachweis von Rückständen in Milch wurde anhand künstlich dotierter Milchproben überprüft. In einem Konzentrationsbereich entsprechend dem ½-, 1- sowie 2-fachen des jeweiligen MRL-Werts von 20 – 100 µg/kg wurden Wiederfindungsraten von 90 – 120 % erreicht.

Damit stehen erstmals unter Routinebedingungen einsetzbare quantitative immunochemische Analyseverfahren zur Verfügung, die den spezifischen Nachweis fast aller der derzeit in der Therapie von Lebensmittel liefernden Tieren eingesetzten Cephalosporine weit unterhalb der festgelegten Rückstandshöchstmengen ermöglichen.

## VI. SUMMARY

### **Optimization and evaluation of enzyme immunoassays for the detection of cephalosporin-antibiotics in milk**

This paper describes the development of monoclonal antibodies (mAbs) for the detection of various relevant cephalosporin-residues in milk. For this purpose, simple, efficient and rapid methods for the synthesis of cephalosporin-protein conjugates were established. MAbs were prepared by immunization of mice with cephalosporin conjugates coupled by an activated ester method. Using established cell fusion techniques, several antibody-secreting hybridomas were obtained, producing antibodies for the detection of cephalexin and ceftiofur, as well as, reported here for the first time, cefoperazone, cefquinome and cephalirin. On the basis of these mAbs, preferentially indirect competitive enzyme immunoassay (EIA)-systems were developed and optimized for the analysis of milk-samples.

With regard to the required sensitivity, the “maximum residue levels” (MRLs) set in Commission Regulation (EU) No 37/2010 were mandatory. All mAbs were able to detect the target antibiotic far below the respective MRL concentrations: the detection limits of the optimized EIA-systems were 0.3 ng mL<sup>-1</sup> (ceftiofur), 0.4 ng mL<sup>-1</sup> (cefquinome), 2.7 ng mL<sup>-1</sup> (cephalexin), 6.1 ng mL<sup>-1</sup> (cefoperazone) and 17.2 ng mL<sup>-1</sup> (cephalirin), respectively, which was approximately between 3.5- and 330-fold below the legal limit.

Specificity studies revealed that binding of the mAbs to cephalosporins was strongly determined by the C7 side chain of the cephalosporins used for immunisation. Therefore, the mAbs showed relevant cross-reactivity only to cephalosporins having a structural similar C7 substituent. However, these cross-reactive cephalosporins are not approved for use in veterinary medicine. Thus, the mAbs – except of the mAb against ceftiofur – enabled the substance-specific detection of cephalosporin residues in food.

The applicability of the assays for drug residue testing in milk was demonstrated by analysing artificially contaminated milk samples. At concentrations corresponding to ½-, 1- and 2-fold of the respective MRL-value of 20 – 100 µg kg<sup>-1</sup>, recovery rates were between 90 – 120 %.

Thus, for the first time, quantitative enzyme immunoassays for use in routine-analysis are available enabling the specific determination of nearly all cephalosporins approved for use in veterinary medicine at concentrations far below the European Union maximum residue limits.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adrian J., Font H., Diserens J.M., Sanchez-Baeza F., Marco M.P. (2009) Generation of broad specificity antibodies for sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of milk samples. *J Agric Food Chem* 57:385-394.

Albrecht M., Baumgartner C. (2007) Neue Verordnung regelt Durchführung des EU-Lebensmittelhygienerechts - Was ändert sich für Milcherzeuger? *MilchPur* 07 (3):8-11.

Allison J.R.D. (1985) Antibiotic residues in milk. *Br Vet J* 141:9-16.

Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. (2004) Industrial enzymatic production of cephalosporin-based  $\beta$ -lactams. S. 179-215 in: *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*, A. A. Brakhage (Hrsg.), Springer Berlin / Heidelberg.

Bartel B., Malczan M., Riemelt I. (2003) *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*. Behr, Hamburg.

Baumgartner C. (2008) Rückstände von Antibiotika in der Milch - Es wird ernst! *MilchPur* 08 (1):6-7.

Baumgartner C., Kloth K., Kreis B. (2010) Antibiotika-Rückstände in der Anlieferungsmilch sicher erkennen. *Deutsche Molkerei Zeitung* 14:23-27.

Beck A., Kinzl L., Bischoff M. (1999) Antibiotikaprophylaxe und Therapie in der Unfallchirurgie. *Unfallchirurg* 102:955-966.

Becker M., Zittlau E., Petz M. (2004) Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 520:19-32.

Bell C., Scannella D. (1994) An evaluation of the LacTek Beta-Lactam Milk Screening Kit. *Int J Dairy Technol* 47:15-16.

Booth J. (1982) Antibiotic residues in milk. *In Pract* 4:100-109.

Brandt P. (2007) Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2005 - Nationaler Rückstandskontrollplan für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Birkhäuser Verlag, Basel.

Bruno F., Curini R., Corcia A.D., Nazzari M., Samperi R. (2001) Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Trace Determination of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Bovine Milk. *J Agric Food Chem* 49:3463-3470.

Bryskier A. (1997) New concepts in the field of cephalosporins: C-3'quaternary ammonium cepheems (Group IV). *Clin Microbiol Infect* 3:s1-s6.

Bryskier A., Aszodi J., Chantot J.-F. (1994) Parenteral cephalosporin classification. *Expert Opin Investig Drugs* 3:145-171.

Bucura C. (1907) Ueber den Uebergang von Arzneistoffen in die Frauenmilch. *Zeitschrift für die experimentelle Pathologie und Therapie* 4:398-413.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. (2010) Tierarzneimittel-Abgabemengen-Register. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Braunschweig.

[http://www.bvl.bund.de/DE/05\\_Tierarzneimittel/01\\_Aufgaben/04\\_UeberwachungBetreuung/06\\_tam\\_TAM\\_Abgabemengen\\_Register/tam\\_TAM\\_Abgabemengen\\_Register\\_basepage.html](http://www.bvl.bund.de/DE/05_Tierarzneimittel/01_Aufgaben/04_UeberwachungBetreuung/06_tam_TAM_Abgabemengen_Register/tam_TAM_Abgabemengen_Register_basepage.html).

Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Bundesministerium für Bildung und Forschung. (2011) DART - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. Bundesministerium für Gesundheit, Berlin.

Cacciatore G. (2005) Screening auf Rückstände von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch: Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Penicillin-bindenden Proteinen. Diss. rer. nat. Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften, Bergische Universität, Wuppertal.

Cacciatore G., Petz M., Rachid S., Hakenbeck R., Bergwerff A.A. (2004) Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x. *Anal Chim Acta* 520:105-115.

Charm Sciences. (2010a) CowSide® II - Broad Spectrum Antibiotic Test for Milk. Charm Sciences, Lawrence, USA. [www.charm.com/resource/file/87/](http://www.charm.com/resource/file/87/)

Charm Sciences. (2010b) Charm II Antibiotic Analysis for Dairy Products at MRL Levels. Charm Sciences, Lawrence, USA. [www.charm.com/resource/file/111](http://www.charm.com/resource/file/111)

Chen L.B., Wang Z.F., Ferreri M., Su J.L., Han B. (2009) Cephalexin residue detection in milk and beef by ELISA and colloidal gold based one-step strip assay. *J Agric Food Chem* 57:4674-4679.

Chen M., Zhu S., Liu X., Luo C., Xu S., Zheng L., Ye F., Yi C., Zhang X. (2010) Cephalosporin compounds comprising a C3 thio-methyl moiety substituted with N-containing heterocyclic group, and a C7 thiourea acetamido group, their preparations and uses thereof. Patent: US 07700581, 20.04.2010

Choma I.M., Kowalski C., Lodkowski R., Burmańczuk A., Komaniecka I. (2008) TLC-DB as an alternative to the HPLC method in the determination of cefacetril residues in cow's milk. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 31:1903-1912.

Christ W. (1991) Pharmacological properties of cephalosporins. *Infection* 19, Suppl. 5:S244-S252.

Cliquet P., Cox E., Van Dorpe C., Schacht E., Goddeeris B.M. (2001) Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group. *J Agric Food Chem* 49:3349-3355.

Companyo R., Granados M., Guiteras J., Prat M.D. (2009) Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Anal Bioanal Chem* 395:877-891.

Daeseleire E., De Ruyck H., Van Renterghem R. (2000) Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1404-1409.

Dalhoff A. (1979) 50 Years of penicillins. *Infection* 7:294-302.

Dayan A.D. (1993) Allergy to antimicrobial residues in food - assessment of the risk to man. *Vet Microbiol* 35:213-226.

De Brabander H.F., Noppe H., Verheyden K., Bussche J.V., Wille K., Okerman L., Vanhaecke L., Reybroeck W., Ooghe S., Croubels S. (2009) Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *J Chromatogr A* 1216:7964-7976.

Demain A.L., Elander R.P. (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75:5-19.

Deshpande A.D., Baheti K.G., Chatterjee N.R. (2004) Degradation of beta-lactam antibiotics. *Curr Sci* 87:1684-1695.

Dewdney J.M., Maes L., Raynaud J.P., Blanc F., Scheid J.P., Jackson T., Lens S., Verschueren C. (1991) Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem Toxicol* 29:477-483.

Di Corcia A., Nazzari M. (2002) Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J Chromatogr A* 974:53-89.

Dietrich R., Usleber E., Märtlbauer E. (1998) The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins. *Analyst* 123:2749-2754.

Dillon P.P., Daly S.J., Browne J.G., Manning B.M., Loomans E., Van Amerongen A., O'Kennedy R. (2003) Application of an immunosensor for the detection of the beta-lactam antibiotic, cephalexin. *Food Agric Immunol* 15:225-234.

Diserens J.-M. (2002) Schnelltestmethoden. Nestlé Research Centre, Lausanne, Schweiz.

Duelli P. (2008) Untersuchungen zum Vorkommen von Antiinfektiva in bayerischer Konsum- und Tankmilch. Diss. med. vet. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

El-Shaboury S.R., Saleh G.A., Mohamed F.A., Rageh A.H. (2007) Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* 45:1-19.

EMA. (2000) Cefoperazone - Summary report (2). Committee for veterinary medicinal products, London.

[http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500011869.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011869.pdf)

Engelhardt H. (1977) Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. 2. ed. Springer, Berlin.

Engvall E., Perlmann P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin antigen-coated tubes. *J Immunol* 109:129-135.

Fernandez F., Hegnerova K., Piliarik M., Sanchez-Baeza F., Homola J., Marco M.P. (2010) A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosens Bioelectron* 26:1231-1238.

Feuerpfeil I., López-Pila J., Schmidt R., Schneider E., Szewzyk R. (1999) Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsblatt (Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz)* 42:37-50.

Food Safety Authority of Ireland. (2002) Rapid Test Kits for the Detection of Antibiotics and Sulphonamides in Milk. Food Safety Authority of Ireland, Dublin. <http://www.scribd.com/doc/6655535/RapidTestKits-Para-Antibioticos-Incluyendo-Beta-Star>

Franek M., Diblikova I., Cernoch I., Vass M., Hruska K. (2006) Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: Immunochemical strategy for generic antibodies and competitors. *Anal Chem* 78:1559-1567.

Frerichs D.H. (2011) Tierarzneimittelrückstände - rechtliche Bewertung. S. 9-17 in: *BEHR'S Jahrbuch: Lebensmittelwirtschaft 2011: Themen, Trends, Termine*, Behr's Verlag, Hamburg.

Friedrich C. (2006) Die Geschichte der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika: Zwischen Zufall und gezielter Entwicklung. *Pharm Unserer Zeit* 35:392-398.

Fung-Tomc J.C. (1997) Fourth-generation cephalosporins. *Clin Microbiol Newsl* 19:129-136.

Ghidini S., Zanardi E., Varisco G., Chizzolini R. (2003) Residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk: confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry after microbial assay screening. *Food Addit Contam* 20:528-534.

Goodfriend T.L., Levine L., Fasman G.D. (1964) Antibodies to bradykinin and angiotensin - use of carbodiimides in immunology. *Science* 144:1344-1346.

Grabarek Z., Gergely J. (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* 185:131-135.

Großklaus D. (1989) Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln Parey, Berlin; Hamburg.

Grzelak E.M., Malinowska I., Choma I.M. (2009) Determination of cefacetile and cefuroxime residues in milk by thin-layer chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 32:2043-2049.

Haasnoot W., Cazemier G., Pre J.D., Kemmers-Voncken A., Bienenmann-Ploum M., Verheijen R. (2000) Sulphonamide antibodies: From specific polyclonals to generic monoclonals. *Food Agric Immunol* 12:15-30.

Hamann J., Heeschen W. (1995) Orientierende Untersuchungen zu Cephalosporinspiegeln in Milch nach intrazisternaler Applikation am laktierenden Rind unter Berücksichtigung von Dosis, Melkregime und Wirkstoff. *Tierarztl Umsch* 50:782-788.

Hamilton-Miller J.M.T. (2000) The cephalosporins and Sir Edward Abraham: Recollections about a great scientist and his part in the discovery of these antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* 53:1003-1007.

Heeschen W. (2010) Tierarzneimittelrückstände - Bedeutung, Beurteilung und gesetzliche Grundlagen. *Food Hygiene & Qualität Praxis* 06/10:1-4.

Heesemann J. (1993) Resistenzmechanismen gegen Betalaktamantibiotika. *Infection* 21:S4-S9.

Heller D.N., Kaplan D.A., Rummel N.G., von Bredow J. (2000) Identification of cephalirin metabolites and degradants in bovine milk by electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 48:6030-6035.

Helmuth R. (1999) Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin Zum Stand der Diskussion. Bundesgesundheitsblatt (Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz) 1999/1:26-34.

Holstege D.M., Puschner B., Whitehead G., Galey F.D. (2002) Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. J Agric Food Chem 50:406-411.

Holthues H., Pfeifer-Fukumura U., Sound I., Baumann W. (2005) Evaluation of the concept of heterology in a monoclonal antibody-based ELISA utilizing direct hapten linkage to polystyrene microtiter plates. J Immunol Methods 304:68-77.

Hornish R.E., Kotarski S.F. (2002) Cephalosporins in veterinary medicine: Ceftiofur use in food animals. Curr Top Med Chem 2:717-731.

Hou J.P., Poole J.W. (1971)  $\beta$ -lactam antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. J Pharm Sci 60:503-532.

Jones G.M., Seymour E.H. (1988) Cowside antibiotic residue testing. J Dairy Sci 71:1691-1699.

Jones R.N. (1987) A review of cephalosporin metabolism: A lesson to be learned for future chemotherapy. Antimicrobic Newsletter 4:69-75.

Jones R.N., Packer R.R. (1984) Cefotaxime, cephalothin, and cephapirin: antimicrobial activity and synergy studies of cephalosporins with significant in vivo desacetyl metabolite concentrations. Diagn Microbiol Infect Dis 2:65-68.

Kachab E.H., Wu W.Y., Chapman C.B. (1992) The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for cephalexin. J Immunol Methods 147:33-41.

Kalman D., Barriere S.L. (1990) Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. Tex Heart Inst J 17:203-215.

Kantiani L., Farre M., Barcelo D. (2009a) Analytical methodologies for the detection of beta-lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28:729-744.

Kantiani L., Farre M., Grases i Freixiedas J.M., Barcelo D. (2010a) Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for beta-lactams and sulfonamides in animal feed. *J Chromatogr A* 1217:4247-4254.

Kantiani L., Farre M., Grases I.F.J.M., Barcelo D. (2010b) Determination of antibacterials in animal feed by pressurized liquid extraction followed by online purification and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 398:1195-205.

Kantiani L., Farre M., Sibum M., Postigo C., de Alda M.L., Barcelo D. (2009b) Fully automated analysis of beta-lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 81:4285-4295.

Karageorgou E.G., Samanidou V.F. (2010) Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk. *J Sep Sci* 33:2862-2871.

Katz S.E., Brady M.S. (1993) Antibiotic residues in food and their significance. S. 572-595 in: *Antimicrobials in foods*, P. M. Davidson und A. L. Branen (Hrsg.), Marcel Dekker, New York.

Kelkar P.S., Li J.T.C. (2001) Cephalosporin allergy. *N Engl J Med* 345:804-809.

Keller C.K., Geberth S. (2007) Tubulointerstitielle Erkrankungen der Niere - Interstitielle Nephropathien durch Nephrotoxine. S. 134 in: *Praxis der Nephrologie*, C. K. Keller und S. Geberth (Hrsg.), Springer, Heidelberg.

Kersten W., Brade W. (1979) Überempfindlichkeit gegenüber Antibiotika. *Infection* 7:580-583.

Kim Y.J., Cho Y.A., Lee H.S., Lee Y.T. (2003) Investigation of the effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. *Anal Chim Acta* 494:29-40.

Kirst E. (2009) Rückstandsbestimmung in Kuhmilch gestern und heute. *Der praktische Tierarzt* 90:356-362.

Kloth K., Rye-Johnsen M., Didier A., Dietrich R., Märtlbauer E., Niessner R., Seidel M. (2009) A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst* 134:1433-1439.

Knappstein K., Suhren G., Walte H.-G., Slaghuis B.A., Zonneveld R.T.F.-v. (2004) Prevention of antibiotic residues - Appropriate management of antibiotic treatment of cows in automatic milking systems. Kiel; Lelystad.  
<http://www.automaticmilking.nl/projectresults/reports/DeliverableD12.pdf>

Knecht B.G., Strasser A., Dietrich R., Märtlbauer E., Niessner R., Weller M.G. (2004) Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Anal Chem* 76:646-654.

Kraack J., Tolle A. (1967) Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch *Milchwissenschaft* 22:669-673.

Kress C. (2010) Untersuchungen zur Anwendbarkeit eines integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch. Diss. med. vet. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Kress C., Seidler C., Kerp B., Schneider E., Usleber E. (2007) Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal Chim Acta* 586:275-9.

Kroker R. (2006) Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. S. 240-251 in: *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, W. Löscher, et al. (Hrsg.), Parey, Stuttgart.

Kroker R., Scherkl R., Ungemach F.R. (2002) Chemotherapie bakterieller Infektionen. S. 353 - 389 in: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, H.-H. Frey und W. Löscher (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart.

Krömker V., Bruckmaier R. (2007) *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Parey, Stuttgart.

Landwirtschaftskammer NRW. (2012) *Cross Compliance 2012 - Informationen über die Einhaltung der Anderweitigen Verpflichtungen*. Landwirtschaftskammer NRW, Bonn.

Lessel J. (1996) Penicillin-bindende Proteine: Das Target der beta-Lactam-Antibiotika. Wirkungsmechanismus von beta-Lactamasen und deren Inhibitoren. *Pharm Unserer Zeit* 25:17-27.

Loomans E.E.M.G., van Wiltenburg J., Koets M., van Amerongen A. (2003) Neamin as an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk. *J Agric Food Chem* 51:587-593.

Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A. (2006) Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 30:673-691.

Madaan A., Li J.T.C. (2004) Cephalosporin allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 24:463-476.

Marshall W.F., Blair J.E. (1999) The cephalosporins. *Mayo Clin Proc* 74:187-95.

Märtlbauer E. (1993) Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. F. Enke, Stuttgart.

Märtlbauer E. (2010) Tierarzneimittel: Analyseverfahren - eine Übersicht. *Food Hygiene & Qualität Praxis* 06/10:13 - 14.

Mason I.S., Kietzmann M. (1999) Cephalosporins - pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology* 10:187-192.

MCS DIAGNOSTICS BV. (2011) Charm ROSA® MRL-8 (8 Minuten Test) - Qualitätskontrolle ohne Kompromiss. MCS DIAGNOSTICS BV, RE Swalmen, Niederlande. [http://www.mcsdiagnostics.com/download/brochures/rosa\\_mrl8\\_d.pdf](http://www.mcsdiagnostics.com/download/brochures/rosa_mrl8_d.pdf)

Medeiros A.A., O'Brien T.F., Rosenberg E.Y., Nikaido H. (1987) Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J Infect Dis* 156:751-757.

Meetschen U., Petz M. (1991) Gaschromatographische Analysenmethode für Rückstände von sieben Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. *Z Lebensm Unters Forsch* 193:337-43.

Meier B. (2008) Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Cefalexin, Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch. Diss. med. vet. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Meyer-Brunot H.G., Randazzo D., Theobald W., Spring P. (1976) Zur Kenntnis der Pharmakokinetik von Cephalosporinen. *Infection* 4:S181-S187.

Meyer U.J., Zhi Z.L., Loomans E., Spener F., Meusel M. (1999) Automated stand-alone flow injection immunoanalysis system for the determination of cephalexin in milk. *Analyst* 124:1605-1610.

Milchprüfing Bayern e.V. (2010) Jahresauswertung 2010 - Hemmstoff-Abzüge. Milchprüfing Bayern e.V., Wolnzach.

<http://www.mpr-bayern.de/3.1/mpr.de/data/media/3298/MPR-JAusw-2010-Hemm-abz.pdf>

MILKU Tierhygiene GmbH. (2011) Gebrauchsanleitung BR-Test® AS Brilliant. MILKU Tierhygiene GmbH, Bovenden Lenglern.

<http://www.ia-c.de/milku/anleitung-brtestbrilliant.pdf>

Miranda A., Blanca M., Vega J.M., Moreno F., Carmona M.J., Garcia J.J., Segurado E., Justicia J.L., Juarez C. (1996) Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *J Allergy Clin Immunol* 98:671-677.

Mitchell J.M., Griffiths M.W., McEwen S.A., McNab W.B., Yee A.J. (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., Anderson K.L., Rushing J.E., Buckley S. (2000) Conversion of cephapirin to deacetylcephapirin in milk and tissues of treated animals. *J Agric Food Chem* 48:498-502.

N. van Hoof, K. de Wasch, H. Noppe, S. Poelmans, H.F. de Brabander. (2003) Detecting veterinary drug residues. in: *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance*, I. E. Tothill (Hrsg.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Nagakura N., Shimizu T., Masuzawa T., Yanagihara Y. (1990) Anti-cephalexin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to cepheems and penams. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93:126-132.

Navratilova P. (2008) Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk - a review. *Czech Journal of Food Sciences* 26:393-401.

Neaves P. (1999) Monitoring antibiotics in milk – the changing world of test methods, British Mastitis Conference, Stoneleigh, UK.

Neu H.C. (1982) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, with particular reference to cefotaxime and other beta-lactam compounds. *Rev Infect Dis* 4:S288-S299.

Nikaido H. (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* 1:516-523.

Nikaido H. (2009) Multidrug resistance in bacteria. S. 119-146 in: *Annu Rev Biochem*.

Nolli M.L., Parenti G. (1991) Antibodies against the antibiotics: an overview. *Ann Ist Super Sanita* 27:149-54.

Normark B.H., Normark S. (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252:91-106.

Ocallaghan C.H. (1979) Description and classification of the newer cephalosporins and their relationships with the established compounds. *J Antimicrob Chemother* 5:635-671.

Oliveira R.V., De Pietro A.C., Cass Q.B. (2007) Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup. *Talanta* 71:1233-1238.

Olson S.C., Beconi-Barker M.G., Smith E.B., Martin R.A., Vidmar T.J., Adams L.D. (1998) In vitro metabolism of ceftiofur in bovine tissues. *J Vet Pharmacol Ther* 21:112-20.

Packhaus Rockmann GmbH. (2011) *Milchtest MT Nachweisgrenzen*. Packhaus Rockmann GmbH, Sendenhorst. [http://www.milchtest.de/MT\\_Nachweisgrenzen.pdf](http://www.milchtest.de/MT_Nachweisgrenzen.pdf)

Plumb D.C. (2008) *Plumb's Veterinary Drug Handbook: Pocket*. Sixth ed. PharmaVet Inc., Stockholm, Wisconsin.

Prescott J.F. (2000) Beta-lactam Antibiotics: Cephalosporins and Cephamycins S. 134-159 in: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, J. F. Prescott, et al. (Hrsg.), Iowa State University Press, Ames.

Quandt B. (2006) Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch mittels Schnelltestsyste men. Diss. med. vet. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Rebe Raz S., Bremer M.G.E.G., Haasnoot W., Norde W. (2009) Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor. *Anal Chem* 81:7743-9.

Rose B.G., Kamps-Holtzapfle C., Stanker L.H. (1995) Competitive indirect ELISA for ceftiofur sodium and the effect of different immunizing and coating antigen conjugates. *Bioconjug Chem* 6:529-535.

Rose B.G., Buckley S.A., Kamps-Holtzapfle C., Beier R.C., Stanker L.H. (1996) Ceftiofur sodium: Monoclonal antibody development and cross-reactivity studies with structurally related cephalosporins. *J Agric Food Chem* 44:622-627.

Sader H.S., Jones R.N. (1993) The fourth-generation cephalosporins: Antimicrobial activity and spectrum definitions using ceftiofur as an example. *Antimicrobic Newsletter* 9:9-16.

Samanidou V.F., Tsochatzis E.D., Papadoyannis I.N. (2008) HPLC determination of cefotaxime and cephalaxine residues in milk and cephalaxine in veterinary formulation. *Microchim Acta* 160:471-475.

Schällibaum M. (1990) Antibiotikatherapie und Rückstände in der Ablieferungsmilch. *Swiss Vet* 7, 8:7-9.

Schenck F.J., Callery P.S. (1998) Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A* 812:99-109.

Schmidt G. (1976) Cephalosporine. Chem Unserer Zeit 10:189-195.

Sendzik J., Stahlmann R. (2006) Widerspruch zu Ehrlichs Paradigma der selektiven Toxizität - Unerwünschte Wirkungen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Pharm Unserer Zeit 35:432-7.

Shaikh B., Moats W.A. (1993) Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. J Chromatogr A 643:369-378.

Somogyi A. (1989) Rückstände von Tierarzneimitteln. S. 51-74 in: Pareys Studentexte 53 - Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln, D. Großklaus (Hrsg.), Parey, Berlin; Hamburg.

Sorensen L.K., Snor L.K. (2000) Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 882:145-151.

Sörgel F., Bulitta J., Landersdorfer C. (2006) Was wir über beta-Lactame wissen und was wir wissen möchten. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der beta-Lactame. Pharm Unserer Zeit 35:438-51.

Stahlmann R., Lode H. (2005) Antibiotika und Chemotherapeutika. S. 789-794 in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann K. Starke (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München.

Stanker L.H., Buckley S., Muldoon M., Moats W.A., Braswell C. (1998) A monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of ceftiofur in milk. Food Agric Immunol 10:121-131.

Sternesjö Å. (2003) Detecting antimicrobial drug residues. S. 75-90 in: Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance, I. E. Tothill (Hrsg.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Stockler R.M., Morin D.E., Lantz R.K., Hurley W.L., Constable P.D. (2009) Effect of milk fraction on concentrations of cephapirin and desacetylcephapirin in bovine milk after intramammary infusion of cephapirin sodium. *J Vet Pharmacol Ther* 32:345-352.

Strasser A., Usleber E., Schneider E., Dietrich R., Burk C., Märtlbauer E. (2003) Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk. *Food Agric Immunol* 15:135-143.

Suhren G. (2002) Inhibitors and residues of veterinary drugs in milk - legal basis, detection methods and detection systems. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 54:35-71.

Suhren G., Knappstein K. (2003) Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods. *Anal Chim Acta* 483:363-372.

Tagawa N., Tamanaka J., Fujinami A., Kiguchi T., Naito T., Takano T., Amino N., Kobayashi Y. (2000) Heterologous enzyme immunoassay for serum androstenediol. *Clin Chim Acta* 296:193-201.

Thal J. (2006) Entwicklung eines immunchemischen Nachweisverfahrens für Cefquinom. Diss. med. vet. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Thal J., Steffen M., Meier B., Schneider E., Adriany A., Usleber E. (2011) Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment. *Anal Bioanal Chem* 399:1051-1059.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2012) Chemistry of Crosslinking. Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C46E01232683>

Theuretzbacher U. (1998) Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren. *Chemotherapie Journal* 7:136-142.

Tijssen P. (1985) Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam.

Toldra F., Reig M. (2006) Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. Trends Food Sci Technol 17:482-489.

Tomasz A. (1986) Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of  $\beta$ -lactam antibiotics. Rev Infect Dis 8:S260-S278.

Töpel A. (2004) Chemie und Physik der Milch. Behr, Hamburg.

Turck M. (1982) Cephalosporins and related antibiotics - an overview. Rev Infect Dis 4:S281-S287.

Tyczkowska K.L., Voyksner R.D., Anderson K.L., Aronson A.L. (1993) Determination of ceftiofur and its metabolite desfuoylceftiofur in bovine serum and milk by ion-paired liquid chromatography. J Chromatogr B 614:123-134.

Usleber E., Litz S., Märtlbauer E. (1998) Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics. Food Agric Immunol 10:317-324.

Van Weemen B.K., Schuurs A. (1975) The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on characteristics of estrogen enzyme-immunoassays. Immunochemistry 12:667-670.

Vetidata. (2011) Vetidata - Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht, in: Institut für Pharmakologie Pharmazie und Toxikologie in der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig (Ed.), Leipzig.

Wang J., MacNeil J.D., Kay J.F. (2011) Chemical analysis of antibiotic residues in food. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

Wang S., Xu B., Zhang Y., He J.X. (2009) Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Sci* 82:53-58.

Waxman D.J., Strominger J.L. (1983) Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 52:825-869.

Wehling M. (2005) *Klinische Pharmakologie*. Thieme, Stuttgart.

Welage L.S., Borin M.T., Wilton J.H., Hejmanowski L.G., Wels P.B., Schentag J.J. (1990) Comparative evaluation of the pharmacokinetics of N-methylthiotetrazole following administration of cefoperazone, cefotetan, and cefmetazole. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2369-2374.

Wesenberg G. (1910) Der Übergang der Arzneimittel in die Milch und des Nahrungsfettes in das Körperfett. *Angew Chem* 23:1347-1351.

Wilke M.S., Lovering A.L., Strynadka N.C.J. (2005)  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 8:525-533.

Wise R. (1990) The pharmacokinetics of the oral cephalosporins - a review. *J Antimicrob Chemother* 26:13-20.

Witte W., Klar I. (1999) Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsblatt (Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz)* 42:8-16.

Xie H., Ma W., Liu L., Chen W., Peng C., Xu C., Wang L. (2009) Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheids in milk. *Anal Chim Acta* 634:129-133.

Zeng S.S., Escobar E.N., Brown-Crowder I. (1996) Evaluation of screening tests for detection of antibiotic residues in goat milk. *Small Ruminant Res* 21:155-160.

---

Zhi Z.L., Meyer U.J., Van den Bedem J.W., Meusel M. (2001) Evaluation of an automated and integrated flow-through immunoanalysis system for the rapid determination of cephalexin in raw milk. *Anal Chim Acta* 442:207-219.

Žvirauskienė R., Šalomskienė J. (2007) An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk. *Food Control* 18:541-547.

## VIII. ANHANG

### 1. Zitierte Gesetze und Verordnungen

#### AMG

Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 13 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (BGBl. I S. 2983) geändert worden ist

#### DIMDI-Arzneimittelverordnung

Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI-Arzneimittelverordnung - DIMDI-AMV) V. v. 24.02.2010 BGBl. I S. 140 (Nr. 7); zuletzt geändert durch Artikel 2 G. v. 22.12.2011 BGBl. I S. 3044

#### „EU-Hygienepaket“

##### VO (EG) Nr. 852/2004

VERORDNUNG (EG) Nr. 852/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene (ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 1)

##### VO (EG) Nr. 853/2004

VERORDNUNG (EG) NR. 853/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 55)

##### VO (EG) Nr. 854/2004

VERORDNUNG (EG) Nr. 854/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 206)

LFGB

Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2011 (BGBl. I S. 1770), das durch Artikel 2 Absatz 17 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (BGBl. I S. 3044) geändert worden ist

Milchgüte-Verordnung:

Milch-Güteverordnung vom 9. Juli 1980 (BGBl. I S. 878, 1081), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 17. Dezember 2010 (BGBl. I S. 2132) geändert worden ist

TÄHAV

Verordnung über tierärztliche Hausapotheken in der Fassung der Bekanntmachung vom 8. Juli 2009 (BGBl. I S. 1760)

VO (EG) Nr. 1774/2002

VERORDNUNG (EG) Nr. 1774/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (ABl. L 273 vom 10.10.2002, S. 1), die zuletzt durch Verordnung (EG) Nr. 208/2006 der Kommission vom 7. Februar 2006 (ABl. L 36 vom 8.2.2006, S. 25) geändert worden ist

VO (EG) Nr. 470/2009

VERORDNUNG (EG) Nr. 470/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates (ABl. L 152 vom 16.6.2009, S. 11)

VO (EU) Nr. 37/2010

VERORDNUNG (EU) Nr. 37/2010 DER KOMMISSION vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (ABl. L 15 vom 20.1.2010, S. 1)

VO (EWG) Nr. 2377/90

VERORDNUNG (EWG) Nr. 2377/90 DES RATES vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs

## 2. Abbildungsverzeichnis

### 2.1. Dissertation

<b>Abb. Nr.</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1	Strukturformeln von Cephalosporin C und der daraus durch Hydrolyse entstehenden 7-Amino-Cephalosporansäure	4
Abb. 2	Struktureller Vergleich von „physiologischem“ und antibiotisch wirksamem Substrat der PBPs sowie Wirkweise von Cephalosporinen an PBPs	10
Abb. 3	Strukturformeln von Cefapirin und Ceftiofur sowie deren antimikrobiell wirksamen Haupt-Metaboliten	13
Abb. 4	Resistenzmechanismen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien im Vergleich	16
Abb. 5	Hemmstoffabzüge in Bayern im Jahresvergleich	64

### 2.2. Publikation

<b>Fig. Nr.</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Fig. 1	Structures of cephalosporins for which an MRL has been set within the EU	37
Fig. 2	Standard curves for the detection of cefoperazone using mAb 2G1 in indirect or direct EIA formats	47
Fig. 3	Standard curves for the detection of ceftiofur using the four different mAbs in an indirect competitive EIA coated with ceftizoxime-NHS-BSA	48
Fig. S1	Standard curves for the detection of cefquinome using the four different mAbs in an indirect competitive EIA coated with cefquinome-NHS-BSA	48
Fig. S2	Standard curves for the detection of cephalixin and cephapirin, using mAb 1F10 and 2F10, respectively, in an indirect competitive EIA coated with the accordant EDC-conjugate	49

### 3. Tabellenverzeichnis

#### 3.1. Dissertation

<b>Tab. Nr.</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Tab. 1	Übersicht über die verschiedenen Untergruppen der $\beta$ -Lactam-Antibiotika	5
Tab. 2	Auswirkungen von Seitenketten-Modifikationen an verschiedenen Cephalosporin-Positionen	6
Tab. 3	Einteilung der Cephalosporine in Generationen	8
Tab. 4	Ursachen für das Entstehen von Antibiotika-Rückständen	19
Tab. 5	Kommerziell verfügbare mikrobiologische Nachweisverfahren für Antibiotika in Milch und deren Nachweisgrenzen für Cephalosporine	26
Tab. 6	Kommerziell verfügbare Schnelltests (Rezeptor- und Immuno-Tests) zum Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch und deren Nachweisgrenzen für Cephalosporine	28
Tab. 7	In der Literatur beschriebene Immunoassay-Systeme zum Nachweis von Cephalosporinen in Milch	31
Tab. 8	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Cephalosporin-Antibiotika in Milch	33
Tab. 9	Sensitivitäts-Vergleich des bereits publizierten Cefapirin-mAk 2F10 mit den nachträglich aus kryokonserviertem Zellmaterial hergestellten mAks	68
Tab. A 1	Cephalosporine mit definiertem MRL-Wert und für Milchrinder zugelassene Präparate	102

### 3.2. Publikation

<b>Tab. Nr.</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Table S1	Concentrations of immunoreagents used in the optimized competitive indirect EIAs for the determination of cephalosporins in buffer solution	43
Table S2	Antiserum titres of mice immunized with cephalosporin-KLH conjugates	45
Table 1	Characteristics of the mAbs and standard curve parameters of the optimized competitive indirect EIAs for determination of cephalosporins in buffer solutions	46
Table 2	Structure-cross-reactivity relationship in the competitive indirect EIA formats for cephalexin using mAb 1F10 and either cephalexin-NHS-BSA or cephalexin-EDC-BSA as the coating antigen	51
Table 3	Structure-cross-reactivity relationship in the EIA formats for cefoperazone using mAb 2G1 and either cefoperazone-NHS-BSA or cefoperazone-EDC-GlcOx as the coating antigen in competitive indirect test systems	52
Table 4	Structure-cross-reactivity relationship in the competitive indirect EIA formats for ceftiofur/desfuroylceftiofur using four different anti-ceftiofur mAbs and ceftizoxime-NHS-BSA as the coating antigen in competitive indirect EIAs	54
Table 5	Structure-cross-reactivity relationship in the competitive indirect EIA formats for cefquinome using two different anti-cefquinome mAbs and cefquinome-NHS-BSA as the coating antigen in competitive indirect EIAs	56
Table 6	Test parameters of the optimized indirect EIA systems for the determination of cephalosporins in milk	57
Table 7	Recovery of cephalosporin antibiotics from artificially contaminated milk samples as determined by specific EIA system (SD = standard deviation; CV = coefficient of variation; n = 5)	58

#### 4. Tabellen

**Tabelle A 1:** Cephalosporine mit definiertem MRL-Wert und für Milchrinder zugelassene Präparate

Cephalosporin	MRL (µg/kg)	Präparat	Vertreiber	Indikation						Route	Wartezeit Milch (Tage)
				kran- ken- erkan- nugen	Atem- wegs- erkran-	derma- tische	Dermati- tis	Panari- tum	Masti- tiden		
Cefacetril	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalexin	100	Rilexine 200 LC	Virbac	-	-	-	✓ <sup>a</sup>	-	i. mm.	3	
		Ubrolexin <sup>1</sup>	Boehringer Ingelheim	-	-	-	✓	-	i. mm.	5	
Cefalonium	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cefapirin	60 (+ DAC)	Masti-Safe	Intervet	-	-	-	✓ <sup>b</sup>	-	i. mm.	3 (45)	
		Metricure	Intervet	-	-	-	-	✓*	i. u.	0	
Cefazolin	50	Celidocin L	Merial	-	-	-	✓ <sup>a</sup>	-	i. mm.	5	
		Celidocin TS	Merial	-	-	-	✓ <sup>b</sup>	-	i. mm.	0 (42)	
Cefoperazon	50	Peracef	Pfizer	-	-	-	✓ <sup>a</sup>	-	i. mm.	4	
Cefquinom	20	Cobactan 2,5 %	Intervet	✓	✓	✓	✓	-	i. m.	1	
		Cobactan 4,5 %	Intervet	✓	✓	✓	✓	-	i. m., i. v.	2	
		Cobactan LC 75 mg	Intervet	-	-	-	✓ <sup>a</sup>	-	i. mm.	5	
		Virbactan 150 mg	Virbac	-	-	-	✓ <sup>b</sup>	-	i. mm.	35	

Cephalosporin	MRL (µg/kg)	Präparat	Vertreiber	Indikation						Route	Wartezeit Milch (Tage)
				kran- erkrank- wega- Atem- wegs-	digitalis	Derma- titis	Panari- tum	Masti- tiden	Endo- metritis *		
Ceftiofur	100 (+ DFC)	Cefenil 50 mg/ml	alfavet	✓	-	✓	-	-	i. m.	0	
		Ceftiocyl 50 mg/ml	Vetoquinol	✓	-	✓	-	-	i. m., s. c.	0	
		Cevaxel 50 mg/ml	CEVA	✓	-	✓	-	-	i. m.	0	
		Eficur 50 mg/ml	MEDISTAR	✓	-	✓	-	✓	i. m., s. c.	0	
		Excenel 1 g bzw. 4 g	Pharmacia GmbH	✓	-	-	-	-	i. m.	1	
		Excenel RTU 50 mg/ml	Pharmacia GmbH	✓	-	✓	-	✓	i. m., s. c.	0	
		Naxcel 200 mg/ml	Pfizer	-	-	✓	-	-	i. m.	0	
		Readycef 50 mg/ml	Calier	✓	-	✓	-	✓	i. m., s. c.	0	
Truleva RTU 50 mg/ml	WdT	✓	-	✓	-	✓	i. m., s. c.	0			

<sup>1</sup>) Kombipräparat mit Kanamycin; <sup>a</sup>) während der Laktationsperiode; <sup>b</sup>) Trockensteller

i. m. = intramuskulär; s. c. = subcutan; i. mm. = intramammär; i. u. = intrauterin

Wartezeit in Klammern: Nach Anwendung an trockenzustellenden Tieren innerhalb 42 T. vor dem Abkalben beträgt die Wartezeit x Tage.

Quelle: Vetidata, 2011

## **IX. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer herzlich für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. R. Dietrich. Seine hervorragende Betreuung, während der er mir immer mit seinem Wissen und seiner Erfahrung zur Seite stand, sowie seine große Sorgfalt bei der Durchsicht dieser Arbeit waren mir eine große Hilfe.

Frau B. Minich danke ich herzlich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Labortätigkeit und für die stetige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Franziska, meinem Opa Paul sowie meinem Freund Bernhard, die mich über den gesamten Zeitraum der Promotion unterstützt und motiviert haben.

Zuletzt möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, hier vor allem meinen Mitdoktoranden Kerstin und Fabian, für das gute Arbeitsklima danken.