

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

Schnelles semi-quantitatives Screening auf  
Antibiotikarückstände in Fleisch

von Christoph Benedikt Kunas

aus München

München 2016

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

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märklbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Richard Dietrich

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

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

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

**Tag der Promotion: 16.07.2016**

Meinen Eltern

# ***Inhalt***

A Einleitung .....	1
B Schrifttum.....	2
1 Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin .....	2
2 Hemmstoffrückstände in Fleisch .....	4
3 Rechtlicher Hintergrund .....	7
3.1 Rückstandshöchstmengen in der EU .....	7
3.2 Rückstandsanalytik nach Kommissionsentscheidung 2002/657/EG .....	9
4 Screeningverfahren zum Nachweis von Antibiotika in Fleisch.....	10
4.1 Mikrobiologische Hemmstofftests.....	10
4.2 Physikalisch-chemische Verfahren.....	13
4.3 Biosensoren.....	16
4.3.1 Messprinzipien häufig eingesetzter Biosensoren .....	16
4.3.2 Biosensor-basiertes Hemmstoffscreening .....	18
C Material und Methoden .....	22
1 Reagenzien, Puffer und Antikörper .....	22
2 Probenmaterial und Aufarbeitung .....	25
3 MCR3 Biosensor.....	27
4 Methodik.....	31
4.1 Erstellung von Standardkurven.....	31
4.2 Untersuchung zur Signalstabilität .....	31

4.3 Spezifität .....	31
4.4 Untersuchung von Matrixeffekten .....	32
4.5 Validierung .....	33
D Ergebnisse .....	36
1 Evaluierung .....	36
1.1 Testempfindlichkeit .....	36
1.2 Signalstabilität .....	40
1.3 Spezifität .....	44
2 Adaption an die Probenmatrix Fleisch .....	47
2.1 Einfluss der Verdünnung .....	48
2.2 Auswahl eines Referenzpuffers .....	50
2.3 Einfluss der Tierart und der Probenbehandlung .....	51
2.4 Ausgleichen der Signalverringerng .....	52
3 Validierung .....	55
3.1 Auswahl der Zielkonzentrationen und Verdünnungsstufe .....	55
3.2 Ermittlung der Cut-off Werte .....	56
3.2.1 Penicilline .....	57
3.2.2 Cephalosporine .....	62
3.2.3 Aminoglykoside .....	65
3.2.4 Makrolide .....	70
3.2.5 Sulfonamide .....	71

3.2.6 Chinolone .....	73
3.2.7 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse .....	76
3.3 Praktische Anwendbarkeit .....	79
3.3.1 Verschleppung.....	79
3.3.2 Haltbarkeit der Mikroarray-Chips .....	80
3.4 Untersuchung von Realproben .....	82
E Diskussion .....	87
1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse.....	88
2 Vergleich mit anderen Screeningverfahren.....	92
F Zusammenfassung .....	101
G Summary .....	102
H Literaturverzeichnis .....	103
I Abkürzungsverzeichnis .....	116
J Zusätzliche Abbildungen .....	118
K Abbildungsverzeichnis.....	122
L Tabellenverzeichnis .....	125
M Danksagung.....	126

## ***A Einleitung***

In der Therapie und Metaphylaxe von Infektionskrankheiten spielen antimikrobiell wirksame Substanzen eine große Rolle. Der häufige Einsatz dieser Wirkstoffe bei fleischliefernden Tieren wird allerdings im Hinblick auf die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen zunehmend kritisch gesehen. Die Applikation von Antibiotika bei Lebensmittel-liefernden Tieren birgt zudem grundsätzlich das Risiko, dass auch bei Einhaltung der guten tierärztlichen und landwirtschaftlichen Praxis unerwünschte Rückstände, die ein potentielles Risiko für den Verbraucher darstellen, in den Produkten nachweisbar sind.

Um dieses Risiko zu minimieren und eine Verunsicherung der Verbraucher zu vermeiden, wird eine schnelle und effiziente Kontrolle von Fleisch auf Überschreitungen der Hemmstoffrückstands-Grenzwerte angestrebt. Die derzeit zum Screening genutzten mikrobiologischen Verfahren weisen allerdings, je nach implementiertem Testkeim, Schwächen in der Detektion der wichtigsten Antibiotikagruppen auf bzw. neigen zu falsch-positiven Ergebnissen (Pikkemaat et al., 2011). Insbesondere der sensitive Nachweis von Antibiotika-Rückständen aus der Gruppe der Aminoglycoside und Chinolone, aber auch der Sulfonamide ist mit den derzeitig genutzten Verfahren nicht immer möglich. Alternative Verfahren, mit denen Fleischproben zeitnah, kostengünstig, sensitiv und zuverlässig auf die verschiedenen Antibiotika-Klassen analysiert werden können, befinden sich überwiegend erst im Entwicklungsstadium.

Mit der Entwicklung des Biosensors MCR3 (Munich Chip Reader, dritte Generation; Kloth et al., 2009) wurde in einer Kooperation des Lehrstuhls für Milchhygiene mit mehreren Projektpartnern ein Biosensorsystem für den antikörperbasierten Nachweis von Hemmstoffrückständen in Milch entwickelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Biosensor-System für die Matrix Fleischsaft zu adaptieren und zu optimieren. Nach einer intensiven Validierungsphase sollte die Einsetzbarkeit des Verfahrens in einer Vergleichsstudie unter Verwendung von definierten hemmstoffbelasteten Fleischproben weiter untermauert werden.



## ***B Schrifttum***

### ***1 Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin***

Der Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen<sup>1</sup> in der tierärztlichen Praxis ist unverzichtbar. Übermäßige oder falsche Anwendung, aber auch der bestimmungsgemäße Gebrauch fördert allerdings die Ausbreitung bakterieller Antibiotikaresistenzen – schon geringste Antibiotikamengen selektieren dafür (Gullberg et al., 2011; Gullberg et al., 2014). Um die weitere Entwicklung und Verbreitung von Resistenzen einzudämmen, wurden bereits im Jahr 2000 von der Bundestierärztekammer Leitlinien zum sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln veröffentlicht und seitdem regelmäßig im Hinblick auf einen optimierten und reduzierten Einsatz von Antibiotika aktualisiert (Bundestierärztekammer, 2015).

In Bayern wurden im Jahr 2013 ca. 141 t antibiotische Wirkstoffe an Tierärzte abgegeben, wobei 80 % auf die drei wichtigsten Wirkstoffklassen Tetrazykline (36 %), Penicilline (31 %) und Sulfonamide (13 %) entfielen. Verglichen mit dem Jahr 2011, in dem 158 t eingesetzt wurden, entspricht dies einem Rückgang um 10,8 % innerhalb von 2 Jahren (LGL, 2015a).

Auch deutschlandweit ist ein rückläufiger Trend bei der Gesamtmenge der verkauften Antibiotika zu beobachten: während 2011 noch insgesamt 1706 t an Tierärzte abgegeben wurden, waren es 2014 nur noch 1238 t (Wallmann et al., 2015). Die Autoren dieser Studie weisen allerdings darauf hin, dass zwar die absolut eingesetzten Antibiotika-Mengen abnehmen, sich gleichzeitig aber auch das Spektrum der eingesetzten Hemmstoffgruppen verschiebt: So wurden zwar weniger Tetrazykline (-40 %), Makrolide (-37 %) und Sulfonamide (-35 %) verkauft, der Absatz von Fluorchinolonen – die wesentlich geringer dosiert eingesetzt werden können (Kroker, 2005) – stieg dagegen deutlich an (+50 % auf 12 t). Wie auch in Bayern waren deutschlandweit weiterhin Penicilline und Tetrazykline die am häufigsten eingesetzten Hemmstoffe, gefolgt von Sulfonamiden, Makroliden und Polypeptid-Antibiotika (BVL, 2015). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der VetCAB-Studie wieder (Merle et al., 2013a; Merle et al., 2013b; van Rennings et al., 2014), bei der neben der Häufigkeit des Einsatzes bestimmter Wirkstoffgruppen auch Daten zu den jeweils behandelten Tierarten erhoben wurden: beim Schwein wurden mengenmäßig hauptsächlich

---

<sup>1</sup>im Folgenden aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung zusammenfassend „Antibiotika“ genannt.

$\beta$ -Lactame und Tetrazykline, beim Broiler Polypeptide und  $\beta$ -Lactame, sowie beim Rind vor allem  $\beta$ -Lactame eingesetzt.

In einer gemeinsamen Studie des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) mit der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wurde der Antibiotikaverbrauch in den Europäischen Ländern im Jahr 2012 verglichen: Insgesamt wurden innerhalb des untersuchten Zeitraumes in der EU 11381,3 t antimikrobielle Substanzen eingesetzt, ein großer Teil davon (7892,0 t) in Tiermedizin und Landwirtschaft (EFSA, 2015a). Drei Länder verbrauchten dabei mehr als die Hälfte aller EU-weit in der Veterinärmedizin genutzten Hemmstoffe: Deutschland (1707 t), Spanien (1693 t) und Italien (1534 t).

Zunehmende Antibiotikaresistenzen sind ein weltweites Problem, es liegen jedoch nur wenige umfassende Daten zum globalen Antibiotikaverbrauch in der Tierproduktion vor. Global wurde der Verbrauch in der Landwirtschaft für das Jahr 2010 auf ca. 63.151 t geschätzt, für das Jahr 2030 wird eine Steigerung auf 105.596 t erwartet (van Boeckel et al., 2015). Die Hauptgründe für die erwartete Steigerung liegen nach Einschätzung der Autoren zum einen in der verstärkten Nachfrage nach tierischem Protein und zum anderen in einem prognostizierten Wandel der globalen Landwirtschaft hin zu intensiveren Haltungsformen.

Die gesamte in Human- und Veterinärmedizin sowie der Landwirtschaft eingesetzte Menge an Antibiotika wurde für das Jahr 2002 auf ca. 100.000–200.000 t geschätzt (Wise, 2002). In den Jahren 2000–2010 stieg die gesamte Menge an verkauften antimikrobiellen Wirkstoffen (Daten aus 71 Ländern) um über 30 % an, wobei der deutlichste Anstieg in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen zu finden war (van Boeckel et al., 2014).

## ***2 Hemmstoffrückstände in Fleisch***

Als Ursachen für Hemmstoffrückstände in Fleisch kommen neben Fehldosierung oder falscher Anwendung bei der Medikamentengabe und Nichteinhaltung der vorgegebenen Wartezeit auch kontaminiertes Futter oder Tränkwasser in Frage (Lee et al., 2001). Auch bei bestimmungsgemäßer Anwendung kann es zu Rückständen kommen, etwa durch eine krankheitsbedingt veränderte Pharmakodynamik mit verlangsamer Biotransformation von Medikamenten in der Leber oder eine geringere Ausscheidungsrate über die Nieren (Renton, 2001).

In Bayern wurden im Jahr 2014 Fleisch und Nieren von 27.000 geschlachteten Tieren mittels Dreiplatten-Hemmstofftest auf Hemmstoffrückstände untersucht (LGL, 2015b). Für 37 dieser Proben (0,14 %) wurde ein positives Screeningergebnis erhalten. In 26 der auffälligen Proben wurden mittels physikalisch-chemischer Verfahren Hemmstoffe gefunden, wobei in 9 Fällen eine Überschreitung der Rückstandshöchstmengen bewiesen werden konnte. Als Rückstände wurden bei diesen Untersuchungen in Schweinefleischproben hauptsächlich Tetrazykline (n = 22) gefunden, Rinderproben waren gleich häufig mit Rückständen aus der Gruppe der Tetrazykline bzw.  $\beta$ -Lactame (n = 9) belastet. Als weitere Wirkstoffgruppen konnten in belastetem Rind- bzw. Schweinefleisch Sulfonamide (n = 8 bzw. 6), Chinolone (n = 5 bzw. 7), Aminoglykoside (n = 2 bzw. 4), Makrolide (jeweils n = 1 für Rind und Schwein) und Amphenicole (n = 1, Rind) identifiziert werden. Im Vergleich zu den vorherigen Jahren ist die absolute Anzahl der bayernweit beanstandeten Proben rückläufig: 2009–2011 wurden jeweils 53 oder mehr Proben als positiv eingestuft, 2012–2013 waren es hingegen nur 43 bzw. 40 Proben (LGL, 2013a; LGL, 2013b).

In einer 2013 durchgeführten Monitoring-Studie wurden am LGL Erlangen 449 Fleischproben (169 Rind- bzw. 175 Schweinefleisch aus dem bayerischen Einzelhandel, sowie 105 Rindfleischproben, die am Schlachthof gezogen wurden) mittels LC-MS/MS auf Hemmstoffrückstände untersucht. Bei Rindfleischproben aus dem Handel konnten in 0,6 % der Fälle, bei Fleisch adulter weiblicher Rinder (am Schlachthof gezogen) in 1 % und bei Schweinefleisch in 45 % der Proben Antibiotikarückstände nachgewiesen werden (LGL, 2014a). Die Konzentration der detektierten Antibiotika (zu 94 % Tetrazykline) lag jedoch in allen Fällen unterhalb der halben maximal zugelassenen Rückstandsmenge.

Deutschlandweit müssen gemäß §10 Abs. 1 Tier-LMÜV (Tierische Lebensmittel-Überwachungsverordnung) bei mindestens 2 Prozent aller gewerblich geschlachteten Kälber und bei mindestens 0,5 Prozent aller sonstigen geschlachteten Huftiere amtliche Proben entnommen und auf Rückstände untersucht werden. Auf Grundlage des Nationalen Rückstandskontrollplans (NRKP), der jährlich die Anzahl und Art der zu analysierenden Proben anhand von Vieh- und Schlachtzahlen des Vorjahres vorgibt, werden bundesweit Hemmstoffrückstandsanalysen durchgeführt. 2013 wurde bei der Untersuchung von insgesamt 12.690 Proben (Rind und Schwein) in zwei Fällen Chloramphenicol, dessen Einsatz seit 1994 verboten ist, gefunden. Metronidazol, ebenfalls verboten, wurde bei zwei Schweineproben detektiert (BVL, 2014). Bei der Untersuchung auf zugelassene Hemmstoffe wurden in zwei Rinderproben Grenzwertüberschreitungen (Gentamicin und Sulfadoxin) gefunden; bei Schweineproben kam es in neun Fällen zu Grenzwertüberschreitungen (Sulfonamide, Trimethoprim, Tetrazyklin, Enrofloxacin). Unabhängig vom NRKP wurden weitere 308.176 Untersuchungen mittels Dreiplattentest, einem mikrobiologischem Hemmstoffscreening, durchgeführt, wobei 0,14 % der Tests ein positives Ergebnis erbrachten. Bei der Nachuntersuchung der positiven Proben sowie von Plan- und Verdachtsproben (zusammen über 320.000 Proben) wurden Überschreitungen der Rückstandshöchstmengen für Tetrazykline (n = 85), Penicilline (n = 69), Chinolone (n = 39), Aminoglykoside (n = 28), Sulfonamide (n = 17) Diaminopyrimidine (n = 13), Makrolide (n = 2), Amphenicole (n = 1) und Cephalosporine (n = 1) gefunden (BVL, 2014).

In Europa wurden 2013 im Rahmen von NRKPs der 28 Mitgliedsstaaten 124.262 Proben auf Antibiotikarückstände untersucht, dabei wurden in 258 Proben (0,21 %) Rückstandsüberschreitungen (teils mit Mehrfachrückständen) festgestellt; dies entspricht dem Niveau der vorausgegangenen sechs Jahre, in denen jeweils 0,18 – 0,29 % der auf Hemmstoffe untersuchten Proben positiv waren (EFSA, 2015).

Zur Häufigkeit und Art von Hemmstoffrückständen sind keine global umfassenden Studien verfügbar. In vielen einzelnen aktuellen Studien aus verschiedenen Ländern wird über den regelmäßigen Nachweis von Antibiotika in Fleischproben berichtet. Zusammengenommen machen diese Studien deutlich, dass Hemmstoffrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs ein globales Problem darstellen. Dies spiegelt sich auch in einigen, im Folgenden beispielhaft vorgestellten Studien wieder: So wurden in einer Studie zu

Antibiotikabelastungen in Rindfleisch in der Türkei in 57 % der 104 untersuchten Proben Chinolonrückstände gefunden (Er et al., 2013). In Madagaskar wurden bei der Analyse der Diaphragmamuskulatur von 967 geschlachteten Schweinen in 37,2 % der Fälle Hemmstoffrückstände detektiert (Rakotoharinome et al., 2014). Eine Studie aus Venezuela wies in 17 % von 150 Schweinefleischproben das (in Venezuela seit 1988 verbotene) Chloramphenicol nach (Briceno-Fereira et al., 2010). Auch aus Vietnam wurde über Hemmstoffrückstände in Rind- (7,4 %, n = 68) und Schweinefleisch (8,8 %, n = 171) berichtet (Yamaguchi et al., 2015a).

### ***3 Rechtlicher Hintergrund***

Um Verbraucher vor Gesundheitsgefahren durch Hemmstoffrückstände zu schützen, wurden auf nationaler und europäischer Ebene Vorschriften für Rückstandshöchstmengen sowie für die Rückstandsanalytik erlassen.

#### ***3.1 Rückstandshöchstmengen in der EU***

Nach dem Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 7. September 2005, Abschnitt 2, §10, ist das Inverkehrbringen von mit Stoffen mit pharmazeutischer Wirkung belasteten Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs verboten, falls für die jeweiligen Stoff festgelegte Höchstgrenzen (Maximum Residue Levels MRLs) überschritten werden. Die Verfahren zur Festlegung der jeweiligen Höchstgrenzen werden in der 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“ bestimmt. Nach dem in dieser Verordnung beschriebenen Verfahren werden unter anderem die MRLs für Hemmstoffe in verschiedenen Geweben und Tierarten festgelegt. Die getesteten Substanzen werden in der Verordnung (EG) Nr.37/2010 der Kommission vom 22.Dezember 2009 „über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung „hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“ in zwei Tabellen aufgelistet: In der ersten Tabelle sind diejenigen Stoffe aufgeführt, für die Rückstandshöchstmengen in essbarem Gewebe bestimmt wurden (entsprechend den früheren Anhängen I, II und III der Verordnung (EWG) Nr.2377/90); in der zweiten Tabelle sind verbotene Substanzen aufgelistet, bei denen selbst bei geringsten Konzentrationen von einer Gesundheitsschädigung ausgegangen wird (entspricht dem ehemaligen Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr.2377/90). Die für die vorliegende Arbeit relevanten MRL-Werte für verschiedene Antibiotika in Muskulatur von Schwein und Rind sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Für Muskulatur der Tierarten Rind bzw. Schwein festgelegte Rückstandshöchstmengen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) einiger im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierter Antibiotika nach EU-Verordnung 37/2010 (Stand Mai 2015)

Hemmstoffklasse	Antibiotikum	Schwein	Rind	Besonderheiten/ Nachgewiesener Stoff
Penicilline	Amoxicillin	50	50	
	Benzylpenicillin	50	50	
	Cloxacillin	300	300	
	Dicloxacillin	300	300	
	Oxacillin	300	300	
	Nafcillin	n.a.	300	inklusive kleiner Wiederkäuer
Cephalosporine	Cefapirin	n.a.	50	Summe von Cefapirin und Desacetylcefapirin
	Cefquinom	50	50	
	Ceftiofur	1000	1000	Summe aller den Betalactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessene Rückstände
Aminoglycoside	Dihydrostreptomycin	500	500	
	Gentamicin	50	50	Summe von Gentamicin C1, C1a, C2, C2a
	Neomycin	500	500	Neomycin B
	Streptomycin	500	500	Werte für Rind gelten auch für kl. Wdk
Makrolide	Tylosin	100	100	Summe aus Tylvalosin und 3-O-Acetyl-Tylosin
	Tylvalosin	50	n.a.	
Sulfonamide	Sulfonamide	100	100	Gesamte Gruppe der Sulfonamide
Chinolone	Danofloxacin	100	200	MRL Rind gilt auch für kleine Wiederkäuer
	Difloxacin	400	400	
	Enrofloxacin	100	100	Summe von Enrofloxacin und Ciprofloxacin
	Flumequin	200	200	
	Marbofloxacin	150	150	
	Oxolinsäure	100	100	Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist

### ***3.2 Rückstandsanalytik nach Kommissionsentscheidung 2002/657/EG***

Um europaweit die Kriterien für Analysemethoden zur Bestimmung von Hemmstoffrückständen zu vereinheitlichen, wurden mit 2002/657/EG: „Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen“ Definitionen und Anforderungen für verschiedene Testsysteme sowie für deren Validierung aufgestellt (Richtlinie EG Nr.657/2002). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit sind darin die Absätze, die Screeningmethoden behandeln. Diese sind definiert als „Methoden, die zum Nachweis des Vorhandenseins eines Stoffs oder einer Klasse von Stoffen in der interessierenden Konzentration verwendet werden. Diese Methoden ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und werden eingesetzt, um eine große Anzahl von Proben auf mögliche positive Ergebnisse zu sichten. Sie sind speziell dafür ausgelegt, falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.“

Screeningverfahren dürfen laut der genannten Entscheidung für eine untersuchte Konzentration maximal eine falsch-negativ-Rate von  $< 5\%$  ( $\beta$ -Fehler) aufweisen. Anhang 2.2 der Verordnung besagt, dass positive Ergebnisse einer Screeningmethode (oder der Verdacht auf positive Ergebnisse) durch ein Bestätigungsverfahren verifiziert werden müssen. Diese Bestätigungsmethoden müssen auf physikalisch-chemischen Prinzipien beruhen. Anhang 3 der Entscheidung 2002/657/EG behandelt die Validierung verschiedener Nachweismethoden, die anhand ihrer Leistungsfähigkeit und des Anforderungsprofils in qualitativ/quantitativ sowie Screening/Bestätigung klassifiziert werden. Als obligatorische Untersuchungen für die Validierung einer Screeningmethode werden dort die Bestimmung des Nachweisvermögens ( $CC\beta$ ), der Selektivität und Spezifität sowie der Anwendbarkeit, Robustheit und Stabilität der Methode aufgeführt (Richtlinie EG Nr.657/2002).



## **4 Screeningverfahren zum Nachweis von Antibiotika in Fleisch**

Um Hemmstoffrückstände in Fleisch zu detektieren, werden verschiedene Screeningverfahren genutzt. Diese lassen sich anhand der zugrundeliegenden Messprinzipien in mikrobiologische, physikalisch-chemische bzw. Antikörper-basierte (Biosensor-) Methoden einteilen.

### **4.1 Mikrobiologische Hemmstofftests**

Die ältesten und bis heute am häufigsten genutzten Hemmstofftests basieren auf der Inhibition des Wachstums ausgewählter Testkeime in Petrischalen (Bogaerts & Wolf, 1980). Dabei wird die zu untersuchende Probe auf einen mit dem Testkeim beimpften Agar verbracht. Eine Kontamination der Probe äußert sich nach Bebrütung des Ansatzes durch das fehlende Wachstum des Testkeims um die Probe; je nach Wirkstoff und Antibiotika-Konzentration kann dieser Hemmhof unterschiedlich ausgeprägt sein. Viele verschiedene Ansätze, die dieses Grundprinzip nutzen, wurden in den vergangenen Jahrzehnten entwickelt. Unterschiede bestehen vor allem im Hinblick auf den eingesetzten Testkeim und der Wahl der Inkubationsbedingungen (Temperatur, pH-Wert). Als Testkeime eingesetzt werden dabei unter anderem *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Geobacillus stearothermophilus* und *Kocurio rhizophila* [früher *Micrococcus luteus* (Tang & Gillevet, 2003)], die Wachstumsbedingungen umfassen pH-Bereiche von pH 6 – pH 8, die Inkubation erfolgt bei 30 – 55 °C für 14 – 24 Stunden. In Tabelle 2 sind häufig genutzte mikrobielle Hemmstofftests zusammengefasst. Mit einer zunehmenden Anzahl von Testkeimen, die zusätzlich bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen bebrütet werden, um dem jeweiligen optimalen Aktivitätsbereich der verschiedenen Antibiotika-Gruppen Rechnung zu tragen, steigt auch die Bandbreite der nachweisbaren Antibiotika: in der Literatur beschrieben sind Methoden bei denen von einer (Koenendierick et al., 1995) bis zu 18 (Myllyniemi et al., 1999) verschiedene Platten eingesetzt werden.

In Deutschland wird in der Routinediagnostik der unter Punkt 9.3 in Anlage 4 der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift Lebensmittelhygiene (AVV LmH) beschriebene 3-Platten Test (AVV LmH) (Testkeim: *Bacillus subtilis* PGA, inkubiert bei 30°C, pH-Werte 6 sowie 7,2 und 8) eingesetzt. Dieser Test ist relativ günstig und einfach durchzuführen, ermöglicht also einen hohen Probendurchsatz. Nachteilig ist allerdings dessen mangelnde Sensitivität bei der Detektion von Sulfonamiden, Chinolonen und Tetrazyklinen im erforderlichen

Konzentrationsbereich (Pikkemaat, 2011), wie sich auch bei der Untersuchung von natürlich gewachsenen hemmstoffhaltigen Proben zeigte (Myllyniemi et al., 2000).

Alternativ zum 3-Platten-Test werden weitere Variationen wie der EU 4-Platten-Test (Testkeime: *Bacillus subtilis* PGA inkubiert bei drei verschiedenen pH-Werten sowie *Micrococcus luteus*), der sensitiver für Aminoglycoside und Tetrazykline ist, aber wiederum Schwächen beim Nachweis von Sulfonamiden und Chinolonen (Okermann et al., 1998) aufweist, eingesetzt. Der Nouws Antibiotic Test (NAT), ein 5-Platten-Test (Testkeime: *Bacillus cereus*, *Kocuria rhizophila*, *Yersinia ruckeri*, *Bacillus pumilus* und *Bacillus subtilis* PGA), der für die Analyse von Nierenflüssigkeit und Fleisch entwickelt wurde (und in modifizierter Form als „Sekundärscreening“ eingesetzt, eine teilweise Hemmstoffidentifikation ermöglicht), zeichnete sich bei Versuchen mit Hemmstoff-Standards in Puffer durch ein sehr breites Nachweisspektrum aus, bei einer späteren Untersuchung von Realproben konnte jedoch eine deutliche Grenzwertüberschreitung (17-fach über MRL) für Gentamicin nicht detektiert werden (Nouws et al., 1999; Pikkemaat et al., 2008). Eine Variation der Platten-Hemmstofftests, die ebenfalls auf der Inhibition mikrobiologischen Wachstums beruht, sind Tube-tests wie Premi-Test® [Stead et al., 2005; Cantwell & O’Keeffe, 2006] oder Explorer® (Gaudin et al., 2009), bei denen die Auswertung anhand eines Indikator-Farbumschlags durchgeführt wird.

Mikrobielle Hemmstofftests bieten den Vorteil, ohne großen Aufwand oder teure Laborgeräte einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, ihre Nachteile liegen zum einen in der Dauer der Testdurchführung, zum anderen in der – meist für Sulfonamide und Chinolone – ungenügenden Empfindlichkeit (Pikkemaat et al., 2011). Eine Identifizierung von Hemmstoffklassen mit mikrobiellen Methoden, etwa durch Zusatz von Penicillinase oder Messen des Hemmhofdurchmessers auf Platten mit verschiedenen Testkeimen, ist nur in begrenztem Umfang möglich (Myllyniemi et al., 2001; Nouws et al., 1999). Für eine Übersichtsstudie aus dem Jahr 2009 wurden Veröffentlichungen zu über 31 mikrobiellen Hemmstofftests (Plattentests sowie Tubetests) verglichen, der Autor kommt dabei zu dem Schluss, dass die untersuchten Tests keine ausreichende Sicherheit für den Verbraucher gewährleisten (Pikkemaat, 2009).

**Tabelle 2:** Übersicht über einige häufig genutzte mikrobielle Hemmstofftests

Test	Matrix	Platten	Testkeime	Inkubation	Bewertung		Referenz
					In dotierten Proben	Getestete Realproben	
EU 3-Platten	Fleisch	3	<i>B. subtilis</i> bei pH 6 sowie 7,2 und 8	18–24 h 30 °C ± 1 °C	Chinolone, Tetrazykline und Sulfonamide nicht auf MRL-Niveau	keine Angaben	AVV LmH
EU 4-Platten	Fleisch	4	<i>Kocuria rhizophila</i> 3 x <i>B. subtilis</i> bei pH 6 sowie 7,2 und 8	37 °C, 14–16h 30 °C ± 1 °C 14–16 h	Sulfonamide und Chinolone nicht auf MRL-Niveau	Sulfamethazin bei 11 × MRL nicht erkannt	Pikkemaat et al. (2011) Okerman et al. (1998)
STAR <sup>1</sup>	Fleisch Milch	5	<i>B. subtilis</i> B.G.A <i>Kocuria rhizophila</i> <i>B. cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>B. stearothermophilus</i>	30 °C, 18 h 37 °C, 24 h 30 °C, 18 h n.a. 55 °C, 18h	β- Lactame bei ≤ MRL Tetracycline bei 2,5 × MRL Sulfonamide bei 3 × MRL Aminoglycoside bei >8 × MRL Florphenicol bei × 10 MRL	keine Angaben	Gaudin et al. (2010)
NAT <sup>2</sup>	Fleisch Niere	5	<i>B.cereus</i> <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Yersinia ruckeri</i> <i>B. pumilus</i> <i>B. subtilis</i>	30 °C, 16–18h 37 °C, 16–18h 30 °C, 16–18h 37 °C, 16–18h 37 °C, 16–18h	keine Angaben	Gentamicin bei 17 × MRL nicht erkannt	Nouws et al. (1999) Pikkemaat et al. (2008, 2011)

<sup>1</sup>STAR = Screening Test for Antibiotic Residues<sup>2</sup>NAT = Nouws Antibiotic Test

## **4.2 Physikalisch-chemische Verfahren**

Das Haupteinsatzgebiet physikalisch-chemischer Methoden in der Hemmstoffanalytik liegt in der – rechtlich so vorgeschriebenen – Bestätigung, Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikarückständen in Proben, die zuvor mit Screeningtechniken als positiv oder verdächtig eingestuft wurden (Richtlinie EG Nr.657/2002). Für diesen Zweck werden meist Varianten der LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry), wie zum Beispiel die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) eingesetzt. Das gemeinsame Grundprinzip dieser Methoden ist die an eine chromatographische Auftrennung gekoppelte massenspektrometrische Detektion von Analyten. Die chromatographische Auftrennung durch LC oder HPLC basiert auf der – je nach Substanz unterschiedlichen – Wechselwirkungen der Analyten mit einer stationären und einer flüssigen Phase: je stärker die Substanz mit der stationären Phase in Wechselwirkung tritt, desto länger ist ihre Retentionszeit.

Das Detektionsprinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Trennung von im Vakuum stabilen Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ). Für die Analyse müssen also die eingebrachten Substanzen durch eine Ionenquelle in freie (positiv oder negativ) geladene Ionen überführt werden, die dann mittels einer angelegten Spannung für die Massenauftrennung beschleunigt werden (Camman, 2001a). Trotz der hohen Empfindlichkeit und Selektivität der massenspektrometrischen Detektion setzen die komplexen Matrices Fleisch und Niere und die im Spurenbereich nachzuweisenden Rückstände eine aufwändige Probenvorbereitung voraus; des Weiteren ist es aufgrund der Heterogenität der zu untersuchenden Wirkstoffklassen nicht möglich, alle interessierenden Antibiotikarückstände mit einer analytischen Methode zu erfassen, weswegen für eine komplette Untersuchung verschiedene Verfahren eingesetzt werden (Gentili et al., 2005; Mompelat, 2015; Dasenaki, 2015).

Neben der Bestätigungsanalytik wird – aufgrund der prinzipiell gegebenen Multianalytfähigkeit – für LC/MS-Systeme zunehmend auch deren Einsatz beim Screening von Proben auf verschiedene Antibiotika propagiert, eine Auswahl an aktuellen Veröffentlichungen zeigt Tabelle 3. Verbesserte Techniken zur Probenaufreinigung und -extraktion, die eine darauffolgende physikalisch-chemische Analyse vereinfachen, zielen ebenfalls in diese Richtung (Bittencourt et al., 2012; Lopes et al., 2011).

---

Grundsätzlich können physikalisch-chemische Methoden Rückstände hochsensitiv detektieren und identifizieren, jedoch ist ihre Anwendbarkeit als Screeningverfahren in der Praxis fraglich, teils aufgrund des hohen Zeitaufwands der Analyse (inklusive der Datenauswertung), vor allem aber aufgrund der hohen Anschaffungs- und Analysekosten (Mungroo & Neethirajan, 2014).

**Tabelle 3:** Ausgewählte Publikationen zum Einsatz von physikalisch-chemischen Verfahren als Screeningmethoden im Bereich der Antibiotika-Rückstandsanalytik

<b>Methode</b>	<b>Extraktionmethode(n)</b>	<b>Matrix</b>	<b>detektierte Hemmstoffklassen</b>	<b>Referenz</b>
LC-MS/MS	Mechanisches Aufbrechen der Zellwände, CH <sub>3</sub> CN- Proteinfällung	Rindfleisch, Geflügelfleisch	Tetrazykline, Sulfonamide, Chinolone	Bittencourt et al. (2012)
UPLC-Quadrupel MS	Extraktion mit 5%iger TCA bzw. CH <sub>3</sub> CN, parallele Injektion der Extrakte	Fleisch, Milch	Penicilline, Sulfonamide, Tetrazykline, Chinolone, Makrolide	Cepurnieks et al. (2015)
LC-Electrospray-MS/MS	Extraktion mit 70 % Methanol	Fleisch, Niere	Penicilline, Sulfonamide, Tetrazykline, Chinolone, Makrolide	Granelli et al. (2007)
LC-LTQ-Orbitrap MS	β-Lactame: Extraktion mit CH <sub>3</sub> CN Andere Hemmstoffe: Extraktion durch CH <sub>3</sub> CN/5%TCA, Aufreinigung über C-18 SPE-Kartusche	Fleisch	β-Lactame, Sulfonamide, Tetrazykline, Chinolone, Makrolide, Aminoglykoside	Hurtaud-Pessel et al. (2011)
UPLC-TOF	Extraktion mit CH <sub>3</sub> CN Aufreinigung über HLB-SPE-Kartusche,	Fleisch, Niere, Leber	Penicilline, Sulfonamide, Tetrazykline, Chinolone, Makrolide	Kaufmann et al. (2008)
LC-MS/MS	CH <sub>3</sub> CN Extraktion mit anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Einsatz von flüssigem Stickstoff	Schweinefleisch	Penicilline, Sulfonamide, Tetrazykline, Chinolone, Makrolide	Lopes et al. (2011)
UPLC-MS/MS	Extraktion mit CH <sub>3</sub> CN, Filtration (PTFE-Membran)	Schweine-, Rind- Geflügelfleisch	β-Lactame, Sulfonamide, Chinolone, Makrolide	Yamaguchi et al. (2015)

### **4.3 Biosensoren**

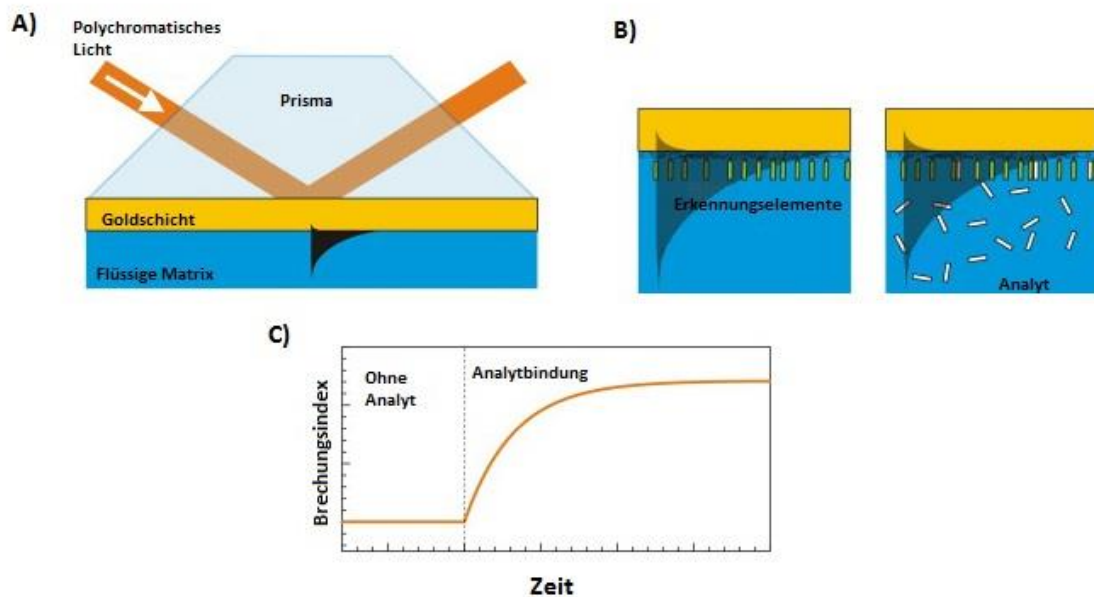
Biosensoren sind nach IUPAC-Definition [Thevenot, Sensors Actuators, 1996] in sich geschlossene, integrierte Systeme, die eine spezifische quantitative oder semi-quantitative analytische Information liefern und die aus einem biologischen Erkennungselement und einem sich dazu in direktem räumlichen Kontakt befindenden Signalgeber bestehen.

Die Vielzahl an entwickelten Biosensoren kann anhand des biologischen Erkennungselements oder anhand der Detektion/des Signalgebers eingeteilt werden. Als Erkennungselement werden – je nach Analyt und Aufgabenstellung – häufig Antikörper, Enzyme, Nukleinsäuren/Aptamere, Proteine oder ganze Zellen/Bakterien genutzt. Als Signalgeber/Detektor-Kombinationen werden unter anderem optische, elektrochemische, piezoelektrische und gravimetrische Prinzipien unterschieden (Thevenot et al., 2001). Lafleur et al. geben eine aktuelle Übersicht über die Bandbreite an Analyten, Erkennungselementen und Detektionsmöglichkeiten (Lafleur et al., 2016).

#### **4.3.1 Messprinzipien häufig eingesetzter Biosensoren**

Im Bereich der Biosensor- und Antikörperbasierten Rückstandsanalytik spielen sowohl im Hinblick auf die Anzahl der peer-reviewed Publikationen und beschriebenen Anwendungsgebiete als auch der Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Testsystemen im Wesentlichen zwei Multi-Analytfähige Verfahren, nämlich Surface Plasmon Resonance (SPR) und Microarrays mit Chemilumineszenz-Readout eine größere Rolle.

Das Messprinzip der Oberflächenspannungsresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR), beruht – vereinfacht beschrieben – auf der Veränderung des Brechungsindex einer ca. 50 nm dicken Metallschicht (Gold, Silber o. ä.) durch die Anlagerung von Analyten an Rezeptoren (z.B. Antikörper), die an diese Metallschicht gekoppelt sind (Cammann, 2001b). Der veränderte Brechungsindex wird, wie in Abbildung 1 dargestellt, als Abweichung in der Reflexion eines Licht- oder Laserstrahls gemessen [Sipova et al., 2013].

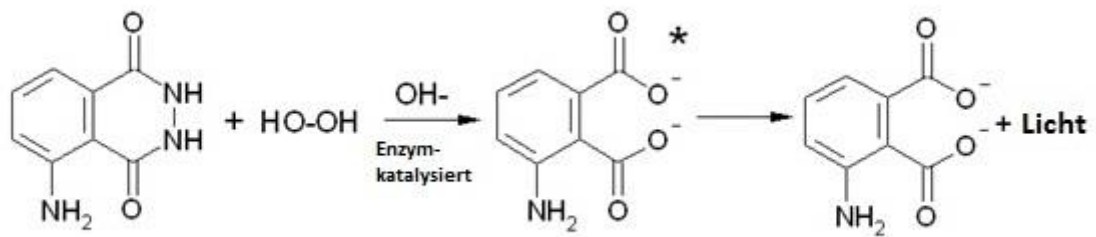


**Abbildung 1:** Grundprinzip von SPR-Biosensoren: A) Anregung der Oberflächenplasmonen B) Goldschicht mit Erkennungselement und Analyt C) Zeitliche Veränderung des Brechungsindex bei Analyterkennung (modifiziert nach Sipova et al., 2013)

SPR-Biosensoren ermöglichen es, Interaktionen unter Beteiligung von Biomolekülen (z.B. Antikörper-Antigen) in Echtzeit zu beobachten (Nguyen et al., 2015). Limitiert wird der Einsatz von SPR-Systemen durch die Masse des Analyten: in einem üblichen Ansatz können Moleküle erst ab einer Größe von ca. 1 – 5 kDa detektiert werden, nur durch einen kompetitiven Versuchsaufbau können auch Haptene bis ca. 200 Da analysiert werden (Cammann, 2001a).

Bei den auf Chemilumineszenz basierenden Microarray-Methoden wird die durch eine (enzymkatalysierte) chemische Reaktion (siehe Abbildung 2) erzeugte Photonenemission mittels CCD (coupled charge device) Kamera erfasst, wobei das grundlegende Testprinzip dem klassischer EIAs im Mikrotiterplattenformat entspricht. Durch die Kopplung des katalysierenden Enzyms an das Kompetitor-Antigen (bei kompetitiven Assays) oder an das Erkennungselement (Sandwich-Assays) kann eine qualitative und quantitative Aussage über den Analyten getroffen werden (Seidl & Niessner, 2014).





**Abbildung 2:** Enzymkatalysierte Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Peroxid

Der Hauptvorteil bei der Verwendung von chemilumineszierenden Substraten als Signalgeber liegt in der sehr guten Sensitivität, die aufgrund des hohen Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses erreicht wird (Roda et al., 2016). Durch die Miniaturisierung im Microarray-Format wird dabei sowohl die Menge an Probenmaterial sowie Reagenzien reduziert, als auch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht (Knecht et al., 2004).

#### **4.3.2 Biosensor-basiertes Hemmstoffscreening**

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit der Entwicklung von Biosensoren zum antikörperbasierten Hemmstoffnachweis einzelner Antibiotika oder -klassen in verschiedenen Matrices (Conzuelo et al., 2014; Fernandez et al., 2012; Fu et al., 2013; Giroud et al., 2009). Für ein effektives Screening muss jedoch ein möglichst breites Spektrum eingesetzter Hemmstoffe unterhalb der vorgeschriebenen Höchstmengen detektiert werden können. Diese Zielsetzung kann nur durch den gleichzeitigen Nachweis verschiedener Antibiotika (-gruppen), idealerweise durch generische mAKs erreicht werden (Zhang et al., 2012). Mit dem von Conzuelo et al. beschriebenen amperometrischen Magnetosensor-basierenden Verfahren konnten Analyten aus drei Gruppen (Cephalosporine, Sulfonamide, Tetracycline) in Milch in fünf Minuten unterhalb der MRLs detektiert, die einzelnen Hemmstoffgruppen jedoch nicht identifiziert werden (Conzuelo et al., 2014b). Ebenfalls in Milch wurde ein SPR-Sensor für den parallelen Nachweis von Enrofloxacin, Sulfapyridin und Chloramphenicol getestet: bei einer Messdauer von > 30 Minuten konnten die Hemmstoffe detektiert und identifiziert werden, wobei allerdings der Nachweis von Chloramphenicol in der Milch nicht in Höhe der erforderlichen Mindestleistungsgrenze möglich war (Fernandez

et al., 2010). Mit einem WIOS (Wavelength Interrogated Optical Sensor), dessen Messprinzip dem der SPR-Sensoren ähnelt (Wiki et al., 2000), konnten Ciprofloxacin, Sulfapyridin und Oxytetracyclin gleichzeitig auf MRL-Niveau identifiziert werden, wobei in einem Blindversuch nur eine von zwei Proben korrekt als Ciprofloxacin-positiv eingestuft wurde (Suarez et al., 2009).

Zwei weitere Biosensor-Systeme, die prinzipiell auf dem gleichen Messprinzip basieren – dem simultanen Antikörper-basierten Nachweis mehrerer Antibiotika auf Multiplex-Microarray-Chips mit anschließendem Chemilumineszenz-Readout – wurden bereits erfolgreich für die Detektion und Identifizierung eines breiten Spektrums von Hemmstoffen in verschiedenen Matrices getestet:

Der Biosensor Evidence-Investigator der Firma Randox (Crumlin, Vereinigtes Königreich) ist ein integriertes Analysegerät, bei dem die Detektionsantikörper auf einen Microarraychip gespottet sind; der Hemmstoff-Nachweis erfolgt unter kompetitiven Bedingungen durch die Verwendung Peroxidase-markierter Antibiotika. Nach der Probenvorbereitung (homogenisieren, mit Waschpuffer verdünnen, 10 min zentrifugieren) wird die Probe für 30 min auf dem Chip inkubiert, nach einem Waschschrift wird Konjugat auf den Chip gegeben und für weitere 60 min inkubiert. Nach erneutem 6-fachem Waschen wird der Chip in Waschpuffer getränkt und nach spätestens 30 min ausgelesen. Die Testdauer beträgt somit über 2 h, die Chips sind für den Einmalgebrauch konzipiert (Gaudin et al., 2015b). Eine Zusammenfassung der verfügbaren Test-Chips ist in Tabelle 4 dargestellt. Für die Test-Chips „ $\beta$ -Lactam Antibiotics Plus“ und „Antimicrobial Array III“ liegen keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen zum Einsatz in Probenmatrix vor.

**Tabelle 4:** Chip-basierte Nachweise von Hemmstoffen mit dem Biosensor Evidence Investigator

Antibiotikachip	getestete Matrix	Nachweisbare Antibiotikagruppen	Nachweisvermögen CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Falsch-Positiv-Rate	Referenz
Microarray Kit II <sup>1</sup>	Fleisch, Fisch und Honig	Chinolone Tetrazykline Ceftiofur Thiamphenicol Streptomycin Tylosin	Enrofloxacin 5; Difloxacin: 75 Tetrazyklin 25; Doxycyclin 50 Ceftiofur 10, DFC <sup>2</sup> 10 Thiamphenicol 1,3; Florphenicol 1 Streptomycin 50; DHS <sup>3</sup> 50 Tylosin 10; Tilmicosin 25	0 % in dotierten Proben gewachsene Proben nicht untersucht	Gaudin et al. (2015b) Gaudin et al. (2014)
Microarray Kit I	Honig	Sulfonamide Trimethoprim	Sulfonamide: 5 - 20 Trimethoprim: 8	4 % in dotierten Proben gewachsene Proben nicht untersucht	Gaudin et al. (2015a)
$\beta$ Lactam Antibiotics Plus	nicht angegeben	$\beta$ -Lactame	nicht angegeben	nicht angegeben	Randox (2016a)
Antimicrobial Array III	nicht angegeben	Chloramphenicol	nicht angegeben	nicht angegeben	Randox (2016b)

<sup>1</sup> Nachweisvermögen in Fleisch angegeben; die Nachweisgrenzen für Fisch und Honig liegen höher

<sup>2</sup> DFC = Desfuroyl Ceftiofur

<sup>3</sup> DHS = Dihydrostreptomycin

Der für die vorliegende Arbeit verwendete Biosensor, nämlich der MCR3 (Munich Chip Reader, 3. Generation) (Kloth et al., 2009), nutzt einen regenerierbaren Microarray-Chip für die gleichzeitige Detektion von zwölf Antibiotika (Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur, Gentamicin, Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfamethazin, Sulfadiazin und Enrofloxacin), die Testdauer liegt unter sieben Minuten. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Evidence Investigator sind hier die Hemmstoffe auf den Chip gespottet (indirekter kompetitiver Ansatz) und die Zugabe der Testreagenzien erfolgt im Durchflussverfahren. Dies ermöglicht zum einen die Regeneration des Messchips und resultiert in einer im Vergleich zu anderen Verfahren deutlich reduzierten Analysezeit. In Abschnitt C.3 ist der Ablauf des Analysegangs detailliert beschrieben. Neben der Hemmstoffanalyse in Milch und Honig wurde auch dieser Sensor für weitere Analyten und Matrices getestet, in Tabelle 5 ist eine Auswahl von Veröffentlichungen zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Einsatz des Biosensors MCR3 für Lebensmittelanalytische Fragestellungen

<b>Analyt</b>	<b>Erkennungselement</b>	<b>Matrix</b>	<b>Referenz</b>
Antibiotika	Antikörper	Milch	Kloth et al. (2009)
Antibiotika	Antikörper	Honig	Wutz et al. (2011)
Mykotoxine	Antikörper	Getreide	Oswald et al. (2013)
Viren-RNA	Oligonukleotide	Wasser	Lengger et al. (2014)
Biotoxine	Antikörper	Wasser	Szkola et al. (2014)
Bakterien	Antikörper	Serum	Meyer et al. (2015)

## ***C Material und Methoden***

### ***1 Reagenzien, Puffer und Antikörper***

Die für vorliegende Arbeit genutzten Hemmstoff-Standardsubstanzen sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

Cefquinomsulfat	Dr. Ehrenstorfer GmbH (C 11064700)
Ceftiofur	Fluka (34001)
Cephapirin-Natriumsalz	MP Biomedicals (18.008.540.530)
Ciprofloxacin	Sequoia Research Products Ltd (SRP03565c)
Cloxacillin-Natriumsalz, Monohydrat	Sigma-Aldrich (C-9393)
Danofloxacin	Sequoia Research Products Ltd (SRP00900d)
Dicloxacillin-Natrium, Monohydrat	Sigma-Aldrich (D-9016)
Difloxacin	Sequoia Research Products Ltd (SRP02930d)
Dihydrostreptomycin Sesquisulfat	Sigma-Aldrich (D-7253)
Enrofloxacin	Sequoia Research Products Ltd (SRP01088e)
Flumequin	Fluka (45735)
Gentamicinsulfat	Serva (22185.02)
Marbofloxacin	Fluka (34039)
Nafcillin-Natriumsalz, Monohydrat	Sigma-Aldrich (N-3269)
Neomycinsulfat	Sigma-Aldrich (N-5285)
Oxacillin-Natrium, Monohydrat	Sigma-Aldrich (O1002)
Oxolinsäure	Sigma-Aldrich (O-0877)
Penicillin G-Natriumsalz	Sigma-Aldrich (P-3032)
Sarafloxacin	Sequoia Research Products Ltd (SRP01073s)
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich (S-6501)
Sulfadiazin	Sigma-Aldrich (S-8626)
Sulfamerazin	Sigma-Aldrich (S-8876)
Sulfamethazin	Sigma-Aldrich (S-6256)
Sulfathiazol-Natriumsalz	Sigma-Aldrich (S-0127)
Tildipirosin	Fluka (33864)
Tilmicosin	Toronto Research Chemicals Inc. (T440500)
Tylosintartrat	Sigma-Aldrich (T-6134)
Tylvalosin	Toronto Research Chemicals Inc. (T89210)

Zur Herstellung von Standard- und Dotierungslösungen wurde jeweils 1 mg Antibiotikum eingewogen und in 1 ml PBS bzw. Methanol (Chinolone und Sulfonamide) gelöst. Die weiteren Verdünnungen auf die gewünschten Zielkonzentrationen erfolgten in PBS. Alle Standardlösungen wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 Stunden verwendet.

### **Puffer**

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS): 145 mmol/l NaCl, 10 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 70 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- PBS mit Zusätzen von Casein (Casein, Sigma-Aldrich, C-8654) und bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich A-7030)
- Weitere Pufferkonzentrate und Reagenzien, die für die Durchführung der Untersuchungen im Biosensor benötigt wurden, waren Bestandteile des von r-Biopharm zur Verfügung gestellten Analysekits (RIDA®CHIP Milk Reagents, RCM20):

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen oder Masse</b>	<b>Bestellnummer</b>
Primärantikörper	1,5 ml	15054
Sekundärantikörper	0,12 ml	13064
Waschpuffer	8 ml	13054
Laufpuffer	120 ml	15044
Regenerationspuffer	100 ml	12054
Casein	1 g	13054
Luminol	10 ml	13054
Peroxid	10 ml	13054

Die Herstellung der gebrauchsfertigen Reagenzien erfolgte entsprechend der im Kit enthaltenen und im Folgenden gekürzt wiedergegebenen Anleitung:

#### *Laufpuffer*

- Das Laufpufferkonzentrat auf 50 °C erwärmen, bis sich evtl. Schlieren oder Feststoff gelöst haben und kräftig schütteln
- Anschließend das Laufpufferkonzentrat 1 : 10 mit demineralisiertem Wasser verdünnen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen

*Regenerationspuffer*

- Das Regenerationspufferkonzentrat auf 50 °C erwärmen, bis sich evtl. Schlieren oder Feststoff gelöst haben und vorsichtig schütteln um eine Schaumbildung zu vermeiden
- Anschließend das Regenerationspufferkonzentrat 1 : 4 mit demineralisiertem Wasser verdünnen

*Waschpuffer*

- Das Waschpufferkonzentrat 1 : 30 mit demineralisiertem Wasser verdünnen

*Antikörperpuffer*

- 0,5 g Casein in 100 ml endverdünnten Laufpuffer geben
- Unter regelmäßigem Rühren auf 95 °C erhitzen bis der Feststoff vollständig gelöst ist und dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen

*Luminol und Peroxid*

- Lagen als gebrauchsfertige Lösungen vor

*Antikörper-Arbeitsverdünnungen*

- Das Primärantikörper-Konzentrat 1 : 40 mit Antikörperpuffer verdünnen
- Das Sekundärantikörper-Konzentrat 1 : 1000 mit Antikörperpuffer verdünnen

Überschüssiger, endverdünnter Lauf-, Regenerations-, Wasch-, bzw. Antikörperpuffer sowie die endverdünnten Antikörper wurden bei Bedarf über Nacht bei 2–8 °C gelagert und entsprechend den Herstellerangaben am Folgetag für die Durchführung der Analysen eingesetzt.

Mit Ausnahme des **monoklonalen Antikörpers** (mAK) zum Nachweis von Penicillin G, der von der Firma Capricorn (Portland, USA) bezogen wurde, wurden alle weiteren für die Analysen eingesetzten Primärantikörper ursprünglich am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch generiert und der Firma r-Biopharm für die Entwicklung des Biosensors zur Verfügung gestellt.

<b>Zielantigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Subtyp</b>
Cloxacillin	1F7	IgG <sub>2a</sub>
Nafcillin	2C8	IgG <sub>2a</sub>
Cephapirin	4A8	IgG <sub>2b</sub>
Ceftiofur	2H6	IgG <sub>1</sub>
Gentamicin	3E7	IgG <sub>2a</sub>
Neomycin	3D7	IgG <sub>1</sub>
Streptomycin	4E2	IgG <sub>1</sub>
Tylosin	2E8	IgG <sub>1</sub>
Sulfamethazin	4D9	IgG <sub>2b</sub>
Sulfadiazin	2G6	IgG <sub>2a</sub>
Enrofloxacin	1F7	IgG <sub>2a</sub>

## ***2 Probenmaterial und Aufarbeitung***

Fleisch von Rind und Schwein wurde in verschiedenen Supermärkten gekauft, Teile des Zwerchfellpfeilers wurden am Schlachthof München und am Schlachthof Recklinghausen direkt nach der Schlachtung entnommen. Alle Proben wurden beim Transport und bis zur weiteren Verarbeitung im Institut auf 4 °C gekühlt.

Hemmstoffhaltige Realproben von Muskulatur von Rind und Schwein wurden vom LGL Erlangen (Frau Dr. Götz-Schmidt) zur Verfügung gestellt. Diese Proben waren bei Routineuntersuchungen mittels Dreiplattentests als verdächtig eingestuft worden, die ursächlichen Antibiotika-Rückstände wurden anschließend am LGL mittels LC-MS/MS qualitativ und quantitativ analysiert. Diese Realproben, die im Rahmen der Validierung der neu entwickelten Biosensor-basierten Screeningmethode eingesetzt wurden, enthielten ein breites Spektrum an Antibiotikarückständen, sowohl über- als auch unterhalb der erlaubten Höchstmengen.

Um aus den Proben Fleischsaft zu gewinnen, wurden die im Folgenden aufgeführten drei Methoden genutzt; die gewonnene Flüssigkeit wurde im Kühlschrank aufbewahrt und noch



am selben Tag untersucht. Dazu wurde Fleischsaft in PBS verdünnt und für Dotierungsexperimente mit entsprechenden Konzentrationen an Antibiotika versetzt.

Für die Einfrier-Methode („Freeze“) wurden Blöcke von 20–40 g Muskulatur bei -20 °C für mindestens 16 h eingefroren und anschließend über Nacht in einem Trichter bei Kühlschranktemperatur wieder aufgetaut. Beim Einfrieren entstehende Eiskristalle zerstören Zellwände in der Probe, beim Auftauen tritt Flüssigkeit (inklusive intrazellulärer Flüssigkeit) aus, die aufgefangen und als Probe verwendet werden kann (Wacheck et al., 2012).

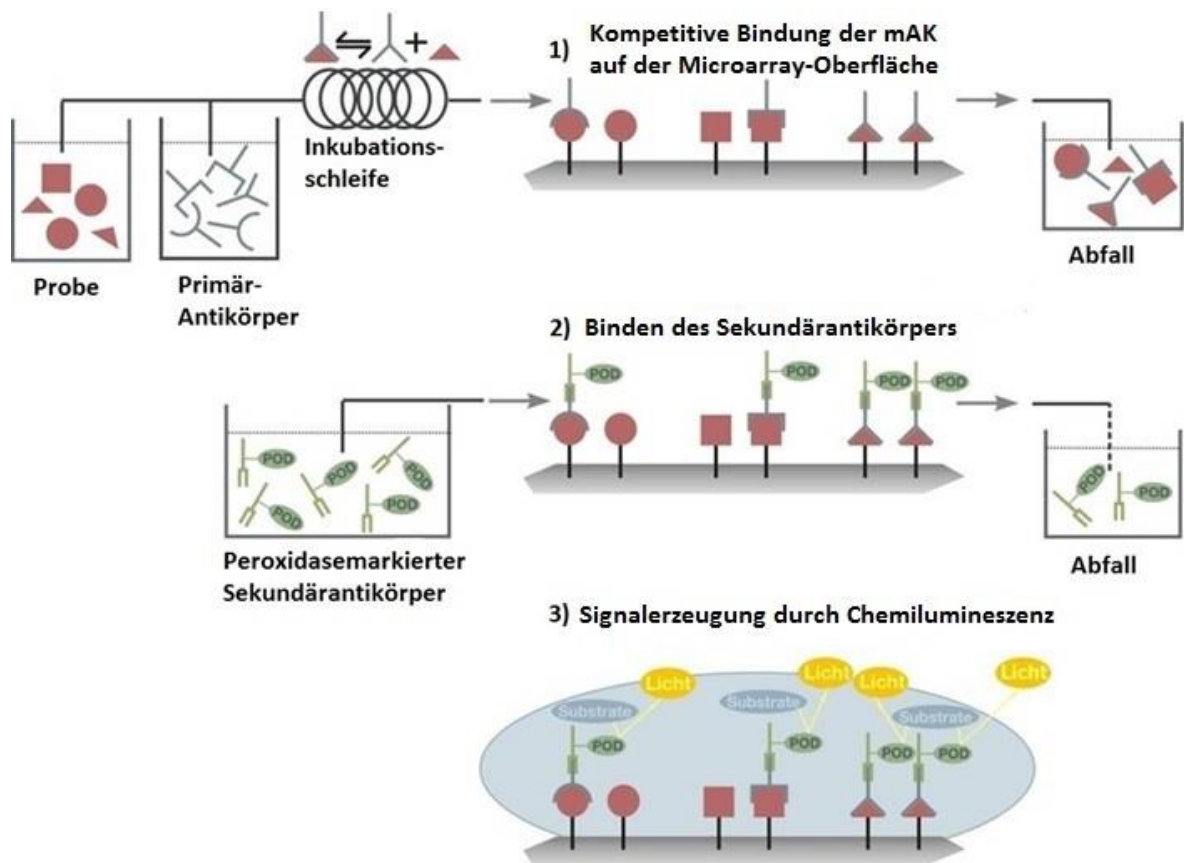
Bei der Pressmethode („Squeeze“) wurden durch Ausüben von Druck auf Muskulaturstücke (unter Zuhilfenahme einer Knoblauchpresse bzw. einer Schraubzwinge und zwei Plexiglasscheiben) Proben gequetscht, bis eine ausreichende Menge Flüssigkeit austrat (Gronover & Wohnlich, 1929). Die Flüssigkeit wurde mittels Pasteurpipette gesammelt und in Reagenzröhren überführt.

Als dritte Methode zur Gewinnung von Probenflüssigkeit wurde eine Zentrifuge genutzt (Heraeus Sepatech, Suprafuge 22). Dazu wurden 20–30 g Probe bei  $10.000 \times g$  und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der dabei austretende Probensaft anschließend mit einer Pasteurpipette entnommen.

### ***3 MCR3 Biosensor***

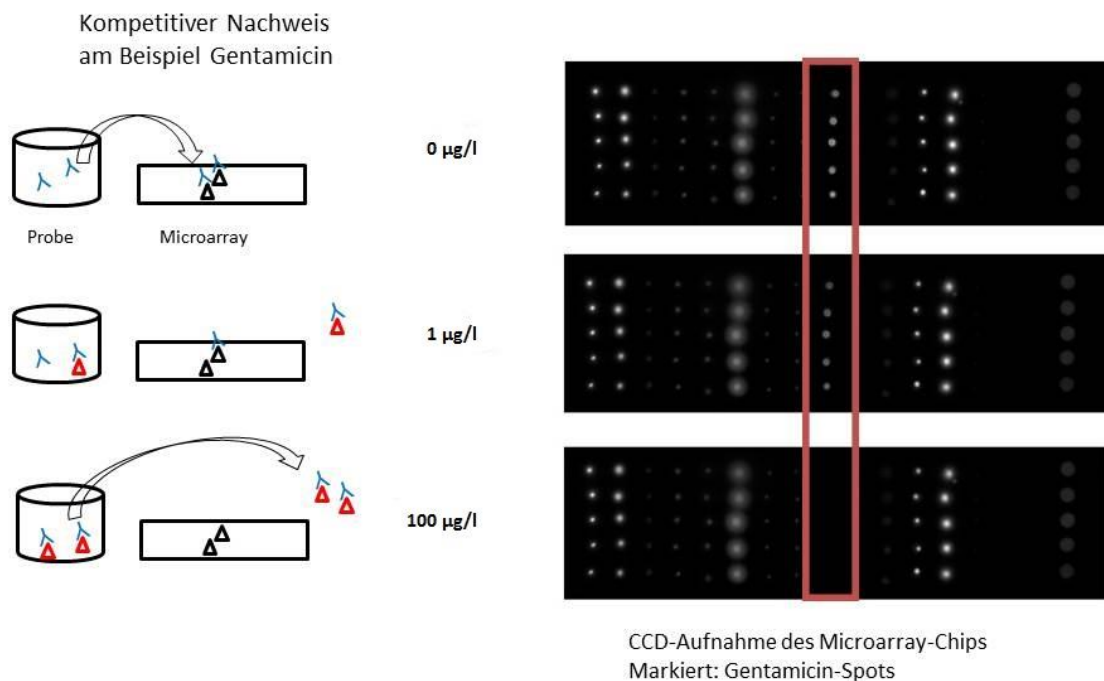
Der in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung von Fleischproben auf Antibiotikarückstände eingesetzte Biosensor wurde ursprünglich für die Analyse von Milch entwickelt. Dabei wurden in einer mehr als zehnjährigen Entwicklungszeit in einer Kooperation des Instituts für Wasserchemie und Chemische Balneologie der TU München mit dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch sowie der GWK Präzisionstechnik GmbH (München) und anderen Projektpartnern verschiedene Prototypen eines Microarray-Biosensors etabliert. Für die Adaption des Biosensors an die Probenmatrix Fleisch stand eine Geräteversion der dritten Generation (MCR3) zur Verfügung.

Das Kernstück des Biosensors ist der Messchip, auf dem zwölf Antibiotika in jeweils 5 Replikaten in definierten Reihen kovalent gebunden sind (Abbildung 4). Die Detektion von Hemmstoffen basiert dabei auf dem Prinzip eines indirekten, kompetitiven Enzym-Immuntests (Abbildung 3): Dabei wird die zu untersuchende Probe mit einem Gemisch der zwölf Primärantikörper kurz vorinkubiert und anschließend über den Messchip geleitet. Primärantikörper, die nicht an Antibiotika in der Probe gebunden sind, binden an die entsprechenden Spots auf dem Microarray (1). Nach einem Waschschrift, bei dem ungebundene mAKs und Probenbestandteile von der Chipoberfläche gespült werden, wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper über den Chip geleitet und bindet an vorhandene Primärantikörper (2). Nach erneutem Spülen wird in einem dritten Reaktionsschritt Peroxid und Luminol über den Microarray geleitet (3), und letztlich das durch die Oxidation des chemilumineszierenden Substrates erzeugte Lichtsignal mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Nach der Messung wird die Chipoberfläche durch einen Regenerationspuffer, der die gebundenen Antikörper degeneriert und entfernt, wieder in den Ausgangszustand gebracht und ist nach ca. 7 Minuten für eine erneute Messung bereit.



**Abbildung 3:** Messprinzip des Antibiotikanachweises im MCR3-Biosensor [(modifiziert nach Rye-Johnsen (Rye-Johnsen, 2008)]

Abbildung 4 verdeutlicht das Messprinzip des Microarray-Readers. Auf der rechten Seite zu sehen sind drei Aufnahmen des Mikrochips, auf den 12 Antibiotika in jeweils 5 Replikaten gespottet wurden (von links nach rechts: Sulfamethazin, Sulfadiazin, Streptomycin, Cloxacillin, Penicillin G, Cephapirin, Neomycin B, Gentamicin, Tylosin, Enrofloxacin, Nafcillin, Ceftiofur sowie Negativ- und Positivkontrolle). Die Bindung der entsprechenden Primärantikörper an die auf dem Chip immobilisierten Antibiotika-Spots erfolgt indirekt proportional zur zunehmenden Konzentration des Analyten in der Probe (hier Gentamicin in PBS). Konsequenterweise können im nächsten Inkubationsschritt auch nur die entsprechenden Mengen an enzymmarkierten Sekundärantikörpern binden, es kommt letztendlich zu einer Verringerung des Chemilumineszenz-Signals. Bei sehr hohen Konzentrationen tritt auch eine vollständige Hemmung auf (hier dargestellt für eine Gentamicin-Konzentration von 100 µg/l).

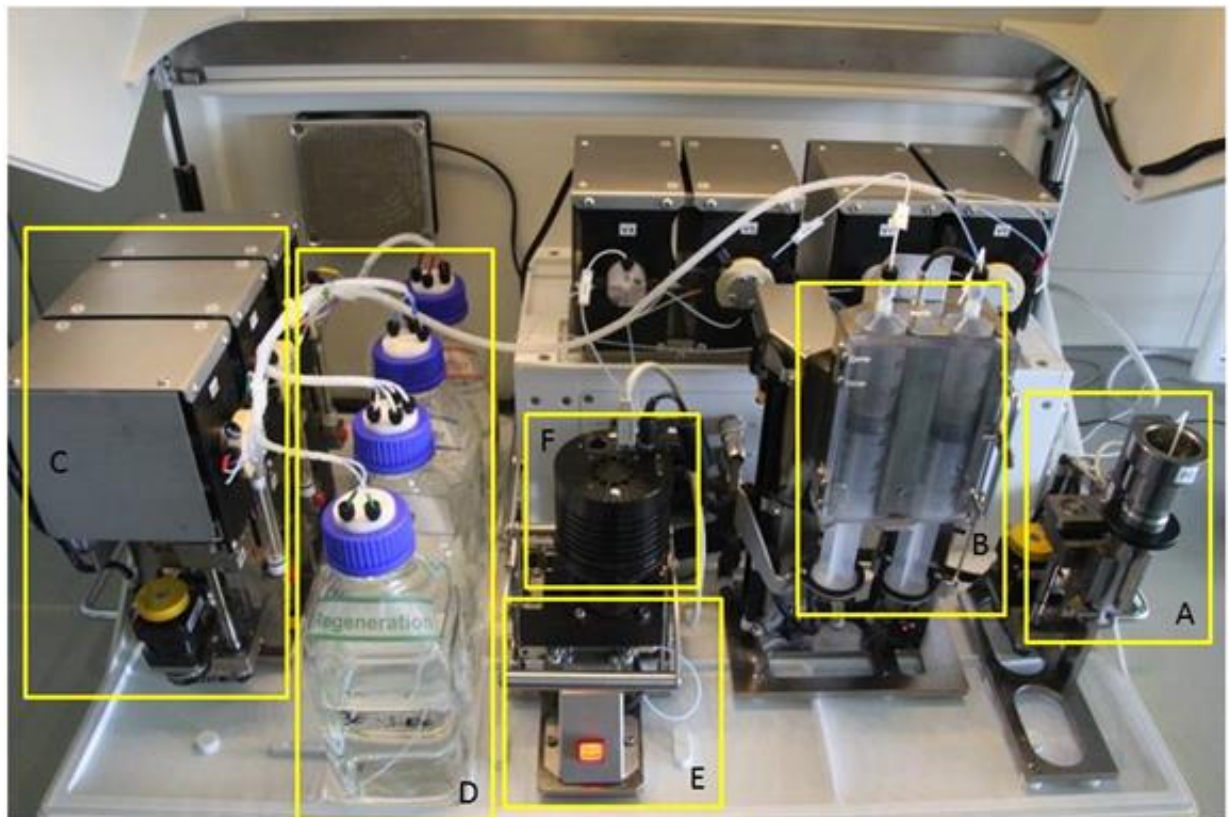


**Abbildung 4:** CCD-Aufnahme eines Microarray-Chip nach Auftrag eines antigenfreien Referenzpuffers (0 µg/l), bzw. von mit Gentamicin kontaminierten Proben (1 µg/l bzw. 100 µg/l)

Die von der Kamera erfasste absolute Signalintensität jedes Spots wird in willkürlich gewählten Einheiten (arbitrary units, [a.u.]) angezeigt. Der Messwert für jeden Antibiotika-Einzelnachweis ist der Mittelwert der absoluten Signale der fünf Replikate, es sei denn, deren Variationskoeffizient (VK) übersteigt 20 %. Falls der VK einer Messung diesen Wert überstieg, wurde von einem Fehler in der Messung ausgegangen, z.B. verursacht durch eine Luftblase oder ein irreguläres Strömungsverhalten der Reagenzien in der Flusskammer und die Messung wurde wiederholt (Wutz, 2013).

Der Aufbau des Biosensor-Gerätes ist in Abbildung 5 dargestellt. Nach Einlegen der Probenspritze (1 ml Volumen, A) wird die Probe mit den Primärantikörpern (B, rechte Spritze) 60 Sekunden in einer Schleife vorinkubiert und über ein System von Kapillaren, Ventilen und Pumpen (C) mit dem Laufpuffer (D) über den in einer Flusszelle versiegelten

Microarraychip (E) gespült. Nachdem der Sekundärantikörper (B, linke Spritze) und anschließend Peroxid/Luminol über den Chip geleitet wurden, wird mit einer CCD-Kamera (F) das eigentliche Messsignal aufgenommen (60 Sek. Belichtungszeit). Von der Probeneingabe bis zum Ergebnis dauert der automatisierte Ablauf ca. 6 min, nach einer 1-minütigen Regenerationsphase ist der Messkanal für eine erneute Analyse bereit. Da der Microarraychip über zwei Messkanäle verfügt, kann während der Regenerationsphase des einen Kanals im anderen bereits eine neue Messung erfolgen und so im parallelen Betrieb eine Messdauer von ca. 6 Minuten pro Probe realisiert werden.



**Abbildung 5:** Aufbau des Biosensors: A = Probenspritze; B = Antikörperspritzen; C = Pumpen- und Ventileinheit; D = Pufferlösungen; E = Flusszelle; F = CCD-Kamera

## **4 Methodik**

### **4.1 Erstellung von Standardkurven**

Der für die praktische Einsetzbarkeit einer Screeningmethode entscheidende Parameter ist deren Fähigkeit, die zu analysierenden Substanzen auf Rückstandshöchstmengen-Niveau (oder besser: darunter) zuverlässig nachweisen zu können. Um in einem Vorversuch die Empfindlichkeiten der auf dem Chip implementierten Einzelnachweise zu bestimmen, wurden für alle Substanzen 7-Punkt Standardkurven erstellt, als Lauf-, bzw. Verdünnungspuffer wurde entsprechend den für die Untersuchung von Milch optimierten Bedingungen 1 % (m/V) Casein in PBS verwendet. Die für die Erstellung der Kurven eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen umfassten den Bereich von 1000 µg/l bis 0,01 µg/l (dezimale Verdünnungen), daneben wurde noch ein Antigen-freier Kontrollansatz (Leerwert) gemessen. Um eine Veränderung der Empfindlichkeiten über wiederholte Mess- und Regenerationszyklen sowie zwischen verschiedenen Chips und Messkanälen auszuschließen, wurden die Standardkurven mit zwei verschiedenen Chips jeweils in beiden Messkanälen nach einem, sowie nach 20 und 40 Regenerationszyklen erstellt. Als Kennzahlen für die einzelnen Antibiotika-Nachweise wurden mittels der integrierten Auswertesoftware die 50 % Hemmdosis ( $IC_{50}$ ), sowie der Arbeitsbereich (vordefiniert als 10–85 % des maximalen Signals) berechnet.

### **4.2 Untersuchung zur Signalstabilität**

Um die Stabilität der absoluten Signale der Einzelnachweise über die komplette vom Hersteller angegebene Chip-Haltbarkeit zu überprüfen, wurden 50 repetitive Mess- und Regenerationszyklen mit hemmstofffreiem Puffer (1 % Casein in PBS) durchgeführt.

### **4.3 Spezifität**

Die Bandbreite an detektierbaren Analyten ist – neben der Sensitivität der Nachweise – ein weiteres wichtiges Merkmal für Screeningmethoden. Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper können das Spektrum der nachweisbaren Hemmstoffe erweitern. Mit generischen Antikörpern – die die gemeinsame Grundstruktur einer Antibiotikaklasse erkennen – können ganze Hemmstofffamilien nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Kreuzreaktivität des zum generischen Nachweis von Chinolon-Antibiotika eingesetzten mAk überprüft. Da wie oben

skizziert der Messablauf im Biosensor sich fundamental von dem eines klassischen EIA-Systems im Mikrotiterplattenformat unterscheidet, konnten die im Rahmen früherer Arbeiten (Acaröz, 2015; Bremus, 2012) gewonnenen Daten zu Kreuzreaktionen für die Validierungsstudie nicht direkt verwendet werden.

Um die Kreuzreaktionen für MRL-belegte Chinolone zu bestimmen, wurden 7-Punkt Standardkurven (jeweils 1000 µg/l bis 0,01 µg/l sowie eine Leerwertmessung) in dem für die Untersuchung zu Fleischproben optimierten Referenzpuffer (0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS) angesetzt. Als Standards wurden alle zur Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren zugelassenen Chinolone, nämlich Ciprofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Enrofloxacin, Flumequin, Marbofloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin eingesetzt. Die relative Kreuzreaktivität (CR) wurde wie folgt berechnet, die Reaktivität mit Enrofloxacin wurde dabei gleich 100 % gesetzt.

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{IC}_{50} \text{ (mol/l) (Enrofloxacin)}}{\text{IC}_{50} \text{ (mol/l) (Chinolone)}} \times 100$$

Die für die Untersuchung von Lebensmitteln relevanten Kreuzreaktivitäten der anderen im Biosensor eingesetzten Antikörper wurden nach demselben Prinzip ermittelt. Überprüft wurden dabei im Cloxacillin-Nachweis die strukturverwandten Isoxazolympenicilline Oxacillin und Dicloxacillin, beim Streptomycin-Nachweis Dihydrostreptomycin, beim Tylosin-Nachweis Tilmicosin und Tylvalosin, sowie die Sulfonamide Sulfamerazin und Sulfathiazol beim Nachweis von Sulfadiazin.

#### ***4.4 Untersuchung von Matrixeffekten***

Nach IUPAC-Definition (International Union of Pure and Applied Chemistry) werden als Matrixeffekte alle Einflüsse einer Probe – ohne den eigentlichen Analyten – auf das Messergebnis zusammengefasst (McNaught & Wilkinson, 1997). Um Matrixeffekte von Fleischsaft auf das Biosensorsignal zu untersuchen, wurde durch freeze-, squeeze- und Zentrifugemethode gewonnener hemmstofffreier Probensaft direkt, sowie 1:2, 1:5 und 1:10 in PBS verdünnt im Biosensor eingesetzt. Diese Versuche wurden sowohl für Fleisch von Rind als auch Schwein durchgeführt.

#### 4.5 Validierung

Die Validierung der Screeningmethode orientierte sich an den in der EU gültigen rechtlichen Vorgaben für analytische Verfahren (ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen), sowie den Richtlinien der Europäischen Referenzlabore für Rückstände von Tierarzneimitteln (Richtlinie EG Nr.657/2002; CRL, 2010). Diese sehen vor, je nach Zielkonzentration 20–60 Messungen mit dotierten Proben sowie 20 Messungen mit hemmstofffreien Proben durchzuführen. Aus den Messergebnissen lassen sich Kennzahlen berechnen, mit deren Hilfe wiederum bestimmt wird, ob das Screeningverfahren für die untersuchte Zielkonzentration validiert werden kann: Aus den Mittelwerten der Messergebnisse, sowie deren Standardabweichungen (SD), können folgende Parameter abgeleitet werden:

- B: Der Mittelwert der Messsignale für die hemmstofffreien Proben
- **T: Der Threshold-Wert der hemmstofffreien Proben, errechnet aus**

$$T = B - 1.64 \times SD(B)$$

T ist der relative Signalwert, der von mehr als 95 % aller hemmstoffnegativen Proben erreicht oder überschritten wird.

- M: Der Mittelwert der Messsignale der hemmstoffhaltigen Proben bei einer definierten Zielkonzentration (idealerweise  $\frac{1}{2}$  MRL)
- **Fm: Der Cut-Off-Wert der hemmstoffhaltigen Proben, errechnet aus**

$$Fm = M + 1.64 \times SD(M)$$

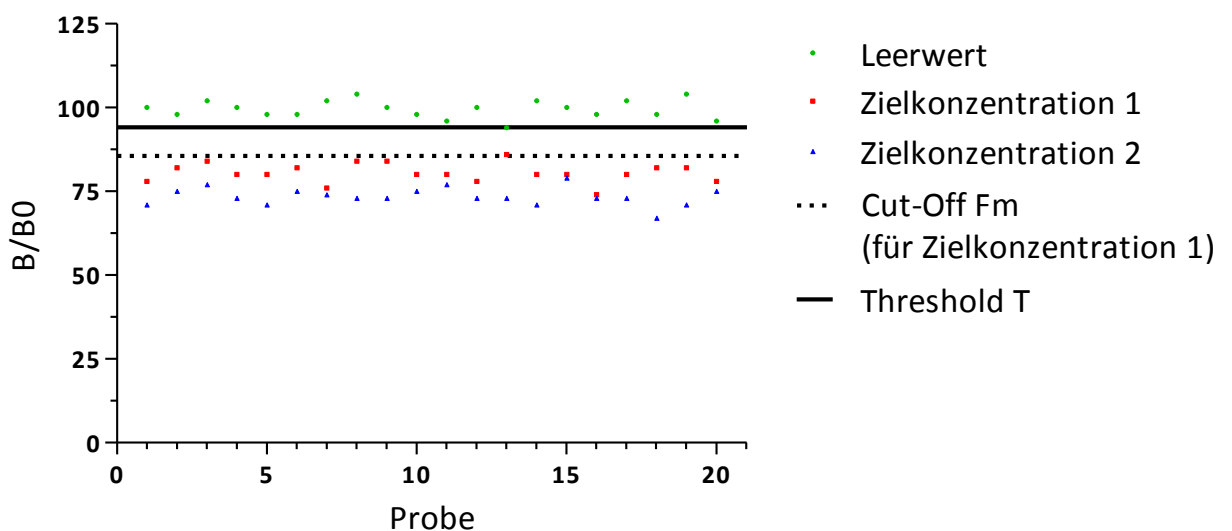
95 % aller Proben, die Hemmstoffrückstände in Höhe der Zielkonzentration des Screenings aufweisen (idealerweise  $\frac{1}{2}$  MRL) ergeben einen relativen Signalwert von Fm oder darunter. Proben mit höher konzentrierten Hemmstoffrückständen ergeben entsprechend Werte unterhalb des Cut-Off-Wertes.



Im Hinblick auf die Validierung eines Screeningverfahrens gilt:

- Falls  $F_m < B$ : Die Methode ist in der Lage, positive von negativen Proben zu unterscheiden.
- Falls  $F_m < T$ : Die erwartete Anzahl an falsch-positiven Resultaten liegt unter 5 %.

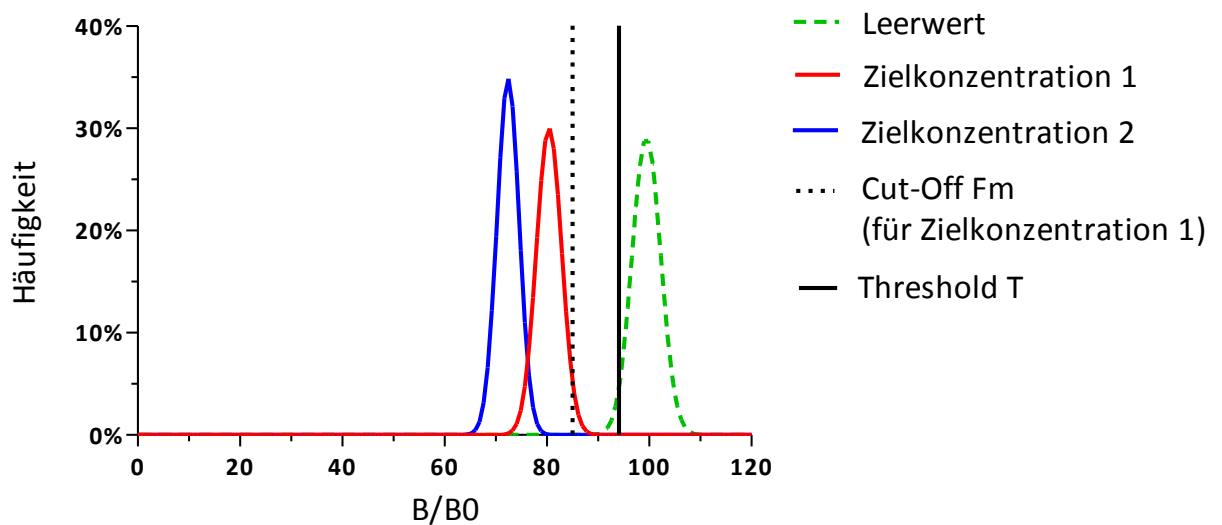
Sind beide Bedingungen erfüllt, liegt die Anzahl an falsch-negativen ( $\beta$ -Fehler) sowie an falsch-positiven Ergebnissen unter 5 % und die Screeningmethode gilt auf dem Niveau der für die Versuche eingesetzten Hemmstoff-Konzentrationen als validiertes Testverfahren (Richtlinie EG Nr.657/2002). Die geringste Konzentration, für die diese Bedingungen erfüllt wird, wird als das Nachweisvermögen ( $CC\beta$ , mit  $\beta = 5\%$ ) des Verfahrens für den untersuchten Analyten bezeichnet. Dieses Validierungsprinzip ist in Abbildung 6 nochmal anhand eines beim kompetitiven Nachweis von Diclazuril erhaltenen Datenpools graphisch erläutert (Stolker, 2012).



**Abbildung 6:** Beispielhafte Darstellung der Validierung eines Screeningverfahrens anhand von Punktwolken nach Stolker (Stolker, 2012)

Für die vorliegende Arbeit wurde zur graphischen Darstellung der Validierungsergebnisse eine alternative Form gewählt (Abbildung 7). In dieser Darstellungsform werden die Messwerte für Leerwert und dotierte Proben als Normalverteilungskurven dargestellt. Dazu wurden die Messwerte (im Beispiel  $B/BO$ , in der weiteren Arbeit relative Signalintensitäten)

in Gruppen zu je zwei Prozentpunkten eingeteilt und die Häufigkeit, mit der Messergebnisse in diese Gruppen fielen, aufgetragen. Nachdem die Werte mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung überprüft wurden, konnten die Normalverteilungskurven berechnet werden. Sowohl für den statistischen Test, als auch für die graphische Darstellung wurde Graph Pad Prism (Version 5.04) verwendet.



**Abbildung 7:** Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse eines Validierungsverfahrens anhand von Normalverteilungskurven

Im gewählten Beispiel ließen sich in allen Messungen positive (analythaltige) und negative (analytfreie) Proben eindeutig unterscheiden, da sich in keinem Fall die Messwerte überschneiden. Wäre dies für eine der 20 Messungen der Fall gewesen, hätte das Screening dennoch validiert werden können, da nach EU-Vorschrift ein  $\beta$ -Fehler (falsch negative Ergebnisse) von bis zu 5 % (entspricht einer Messung aus 20) toleriert werden kann (Richtlinie EG Nr.657/2002). Als Nachweisvermögen ( $CC\beta$ ) eines Screeningverfahrens ist die Konzentration eines Analyten definiert, die mit einem  $\beta$ -Fehler  $\leq 5\%$  nachgewiesen werden konnte. Nach diesem Validierungsprinzip wird  $CC\beta$  also nicht rechnerisch ermittelt, dieser Parameter kann somit nur experimentell bestimmt werden. Im gegebenen Beispiel entspricht also die niedrigere Zielkonzentration 1 dem Nachweisvermögen  $CC\beta$  der Methode

## ***D Ergebnisse***

### ***1 Evaluierung***

Ziel der Evaluierungsphase der vorliegenden Arbeit war es, die grundsätzliche Eignung des Biosensorsystems für den Nachweis von Hemmstoffrückständen in Fleisch zu überprüfen. Um mögliche Vor- und Nachteile des Verfahrens zu identifizieren, wurden sowohl die Testempfindlichkeit der Einzelnachweise, wie auch das Spektrum der nachweisbaren Substanzen und die Stabilität des Messsignals in Abhängigkeit vom Mess- bzw. Regenerationszyklus überprüft.

#### ***1.1 Testempfindlichkeit***

Um die Empfindlichkeit der Einzelnachweise zu bestimmen wurden dezimale Verdünnungsreihen einer Multistandardmischung (je 1000 µg/l; 6 dezimale Verdünnungen in 1 % Casein/PBS) bzw. ein antigenfreier Kontrollansatz im Biosensor gemessen. Anhand der erstellten Standardkurven wurden der Testmittelpunkt ( $IC_{50}$ ) sowie der Arbeitsbereich (in der im System integrierten Software definiert als 10 – 85 % des maximalen Signals) errechnet. Ein Vergleich der ermittelten Testsensitivität mit den entsprechenden MRLs für alle untersuchten Substanzen ist in Tabelle 6 dargestellt. Die Testmittelpunkte liegen in allen Fällen deutlich unter den zugelassenen Höchstmengen: für Cephapirin liegt der  $IC_{50}$  um Faktor fünf unter dem entsprechenden MRL, für Ceftiofur, das mit 1000 µg/kg unter den untersuchten Antibiotika die höchste erlaubte Rückstandskonzentration in Fleisch hat, beträgt der Faktor sogar etwa 500. Im Hinblick auf den angestrebten Einsatz des Testsystems für den Nachweis der Rückstände in Fleischsaft zeigten die gewonnenen Daten, dass die Sensitivität der Analysemethode eine Verdünnung der Proben um bis zu Faktor 5 erlaubt – limitierender Faktor ist hierbei die Empfindlichkeit des Cephapirinnachweises – und dass es prinzipiell möglich sein sollte, ein Screening-Verfahren zum Nachweis der auf dem Biosensor-Chip implementierten Hemmstoffe in Fleischproben unterhalb der rechtlich vorgeschriebenen Rückstandshöchstmengen zu etablieren.

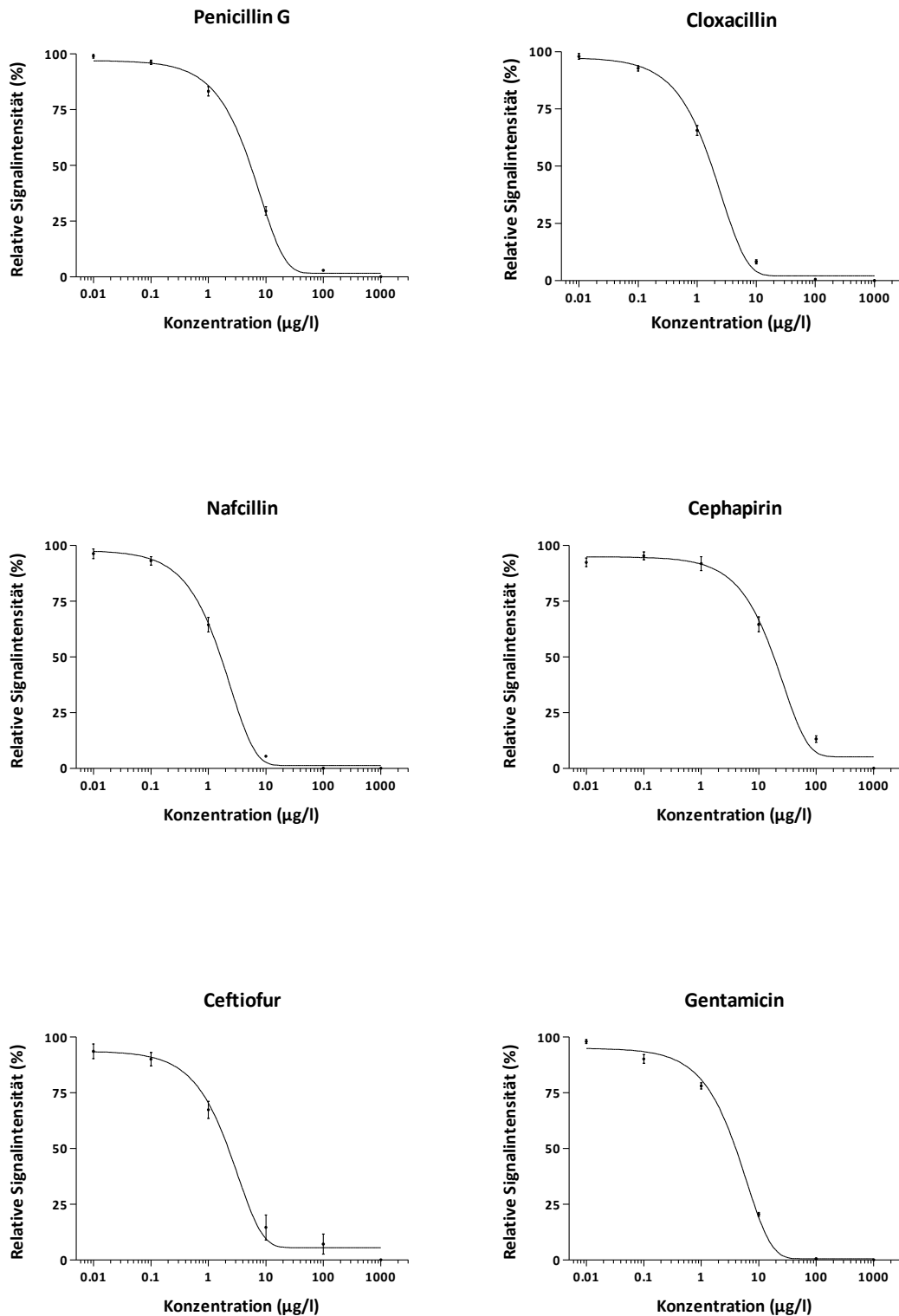
**Tabelle 6:** Testempfindlichkeiten des Biosensor-Systems zum Nachweis von Hemmstoffen in Pufferlösung (in 1 % Casein/PBS). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 3 Standardkurven pro Antibiotikum. Die Standardkurven wurden mit verschiedenen Chips jeweils zu Beginn einer Messreihe (Zyklus 1–10), nach mindestens 20 Regenerationszyklen (20–30), sowie zum Ende einer Messreihe (Zyklus 40–50) erstellt.

Hemmstoff	MRL <sup>1</sup> (µg/kg)	Testmittelpunkte (IC <sub>50</sub> )			Arbeitsbereich (µg/l)
		1-10	20-30	40-50	
Penicillin G	50	3,2 ± 0,2	5,3 ± 2,6	5,4 ± 1,4	0,8 - 27,0
Cloxacillin	300	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,3 - 5,7
Nafcillin	300	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,3	0,3 - 6,9
Cephapirin <sup>2</sup>	50	8,0 ± 3,2	10,9 ± 4,4	8,7 ± 4,3	2,1 - 104
Ceftiofur	1000	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,6	1,5 ± 0,6	0,2 - 6,6
Gentamicin	50	3,0 ± 0,4	3,2 ± 0,7	3,4 ± 0,9	0,7 - 32,1
Neomycin B <sup>2</sup>	500	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,5 - 6,8
Streptomycin	500	6,2 ± 1,8	7,9 ± 1,6	8,5 ± 2,3	1,7 - 38,0
Tylosin	100	13,5 ± 2,4	12,5 ± 1,8	16,4 ± 2,3	2,9 - 77,5
Sulfamethazin	100	11,5 ± 2,4	14,3 ± 2,0	12,5 ± 1,6	1,4 - 145
Sulfadiazin	100	15,3 ± 2,0	18,2 ± 4,8	14,7 ± 3,9	2,3 - 182
Enrofloxacin	100	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,1 - 2,8

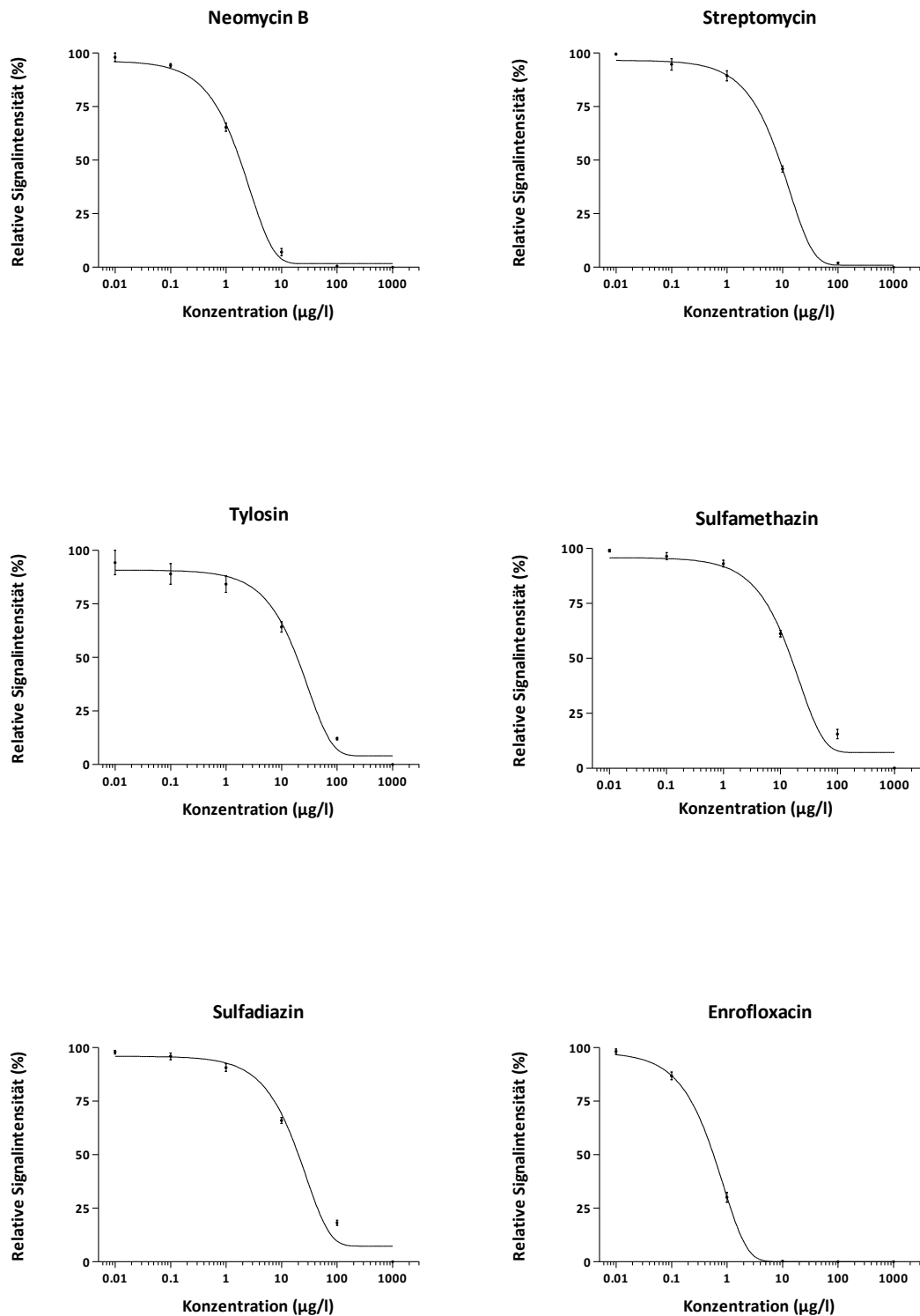
<sup>1</sup> Sind für Fleisch von Rind und Schwein unterschiedliche MRLs vorgeschrieben, ist der jeweils niedrigere angegeben

<sup>2</sup> MRL nur für Fleisch vom Rind festgelegt

Um tendenzielle Abweichungen in der Testsensitivität im Laufe mehrerer Mess- und Regenerationszyklen, sowie zwischen verschiedenen Chips und Messkanälen zu identifizieren wurden die Standards direkt am Anfang eines Messtages, sowie nach 20 und 40 Zyklen gemessen. Auffällig war hier, dass das absolute Signal der Einzelnachweise für hemmstofffreie Messungen über wiederholte Messzyklen abfiel. Dieser Effekt wurde daher intensiver überprüft, die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt (D.1.2) detailliert dargestellt. Trotz der Reduktion der absoluten Signalstärke blieb aber die Empfindlichkeit der Analysen konstant, in Abbildung 8 und 9 sind die für die jeweiligen Einzelnachweise erstellten Standardkurven dargestellt.



**Abbildung 8:** Standardkurven für die auf dem Chip implementierten Antibiotika-Nachweise von Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur und Gentamicin. Die 7-Punkt Standardkurven wurden in Puffer (1 % Casein/PBS) erstellt, die Auswertung erfolgte durch die integrierte Software.



**Abbildung 9:** Standardkurven für die auf dem Chip implementierten Antibiotika-Nachweise von Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfamethazin, Sulfadiazin und Enrofloxacin. Die 7-Punkt Standardkurven wurden in Puffer (1 % Casein/PBS) erstellt, die Auswertung erfolgte durch die integrierte Software.

## **1.2 Signalstabilität**

Die bei der Untersuchung der Empfindlichkeit der Einzelnachweise beobachtete Verringerung der absoluten Signale über mehrere Mess- und Regenerationszyklen wurde näher untersucht, indem an 4 Tagen auf vier verschiedenen Microarraychips hemmstofffreier Puffer (1 % Casein/PBS) über 50 aufeinanderfolgende Zyklen hinweg gemessen wurde. Die relativen Restsignal-Intensitäten (in % des Ausgangswertes) sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

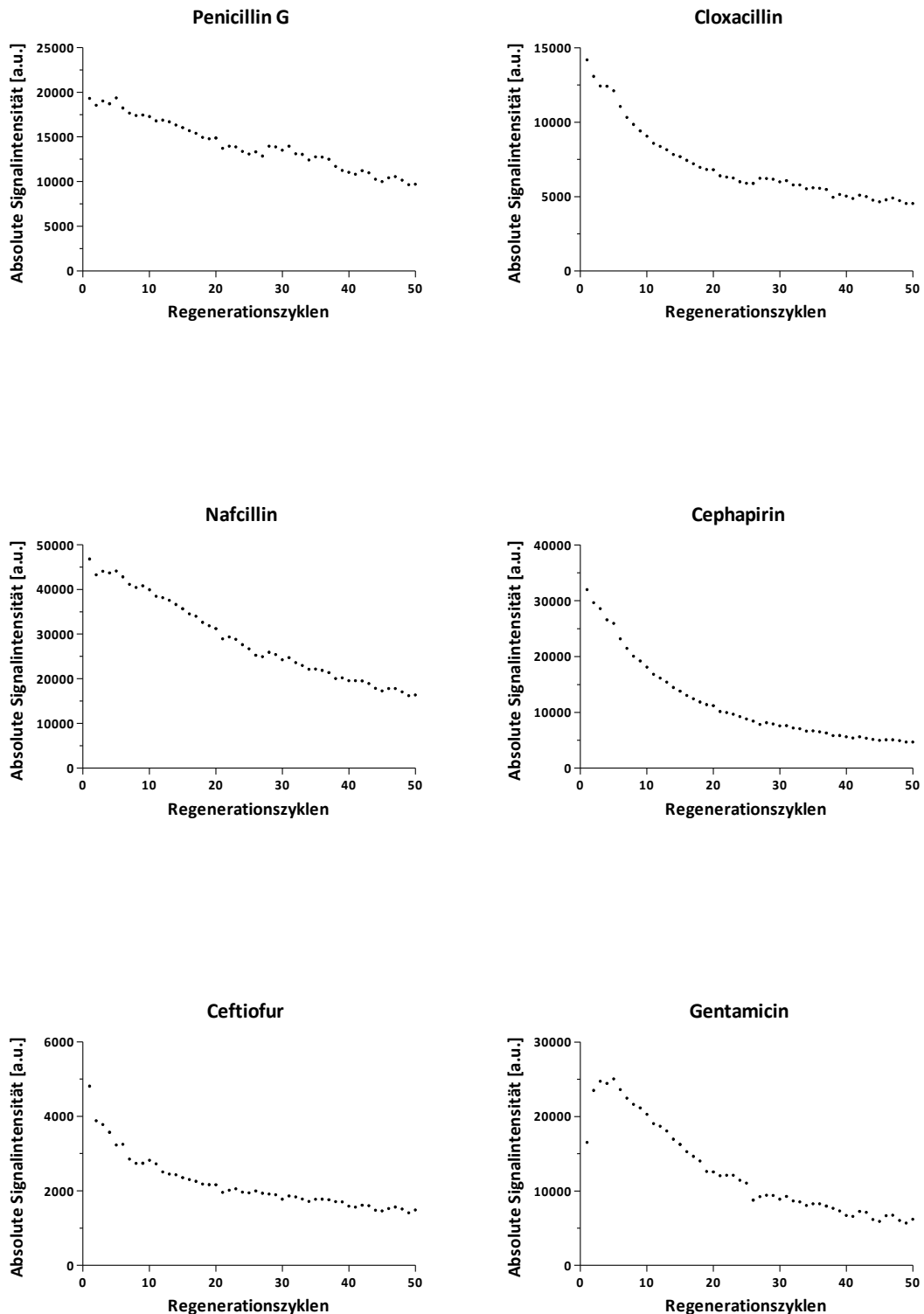
Die Signale der einzelnen Tests zeigen über wiederholte Messzyklen einen teils sehr deutlichen Signalverlust: Nach einem kompletten Untersuchungsgang mit 50 Messzyklen verringerte sich das Messsignal für hemmstofffreien Puffer im Mittel für sieben Nachweise (Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur, Gentamicin, Sulfadiazin und Enrofloxacin) auf unter 50 % des Startsignals, den deutlichsten Signalverlust zeigte dabei Cephapirin (21 % Restsignal). Für Penicillin G, Neomycin B und Sulfamethazin lag dieser Wert zwischen 51–64 %. Lediglich der Streptomycin- und der Tylosinnachweis zeigten mit 85 % bzw. 86 % relativem Restsignal eine deutlich weniger ausgeprägte Signalreduktion.

Unabhängig zu den bei fast allen Einzelnachweisen zu beobachtendem ausgeprägtem Abfall der Signalintensität, konnten bei den jeweiligen Tests auch zyklusabhängige Unterschiede beobachtet werden: Während, wie in Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellt, für die meisten Tests (Penicillin G, Nafcillin, Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfamethazin, Sulfadiazin und Enrofloxacin) das absolute Signal linear abfällt, waren bei Cloxacillin, Cephapirin, Ceftiofur und Gentamicin die Verlaufskurven durch eine anfängliche fast exponentielle Reduktion gefolgt von einer Stabilisierung des Signalverlustes charakterisiert. Gründe für diesen Effekt konnten in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Orientierende, nicht dargestellte Versuchsreihen weisen darauf hin, dass ein „Abwaschen“ der immobilisierten Antibiotika aufgrund einer unspezifischen Anlagerung an die Chipoberfläche während des Spotting-Prozesses oder eine zunehmende Blockierung der Bindungsstellen bedingt durch ein ungenügendes Entfernen der Primärantikörper, bzw. eine Kombination dieser beiden Ursachen hierfür verantwortlich ist.

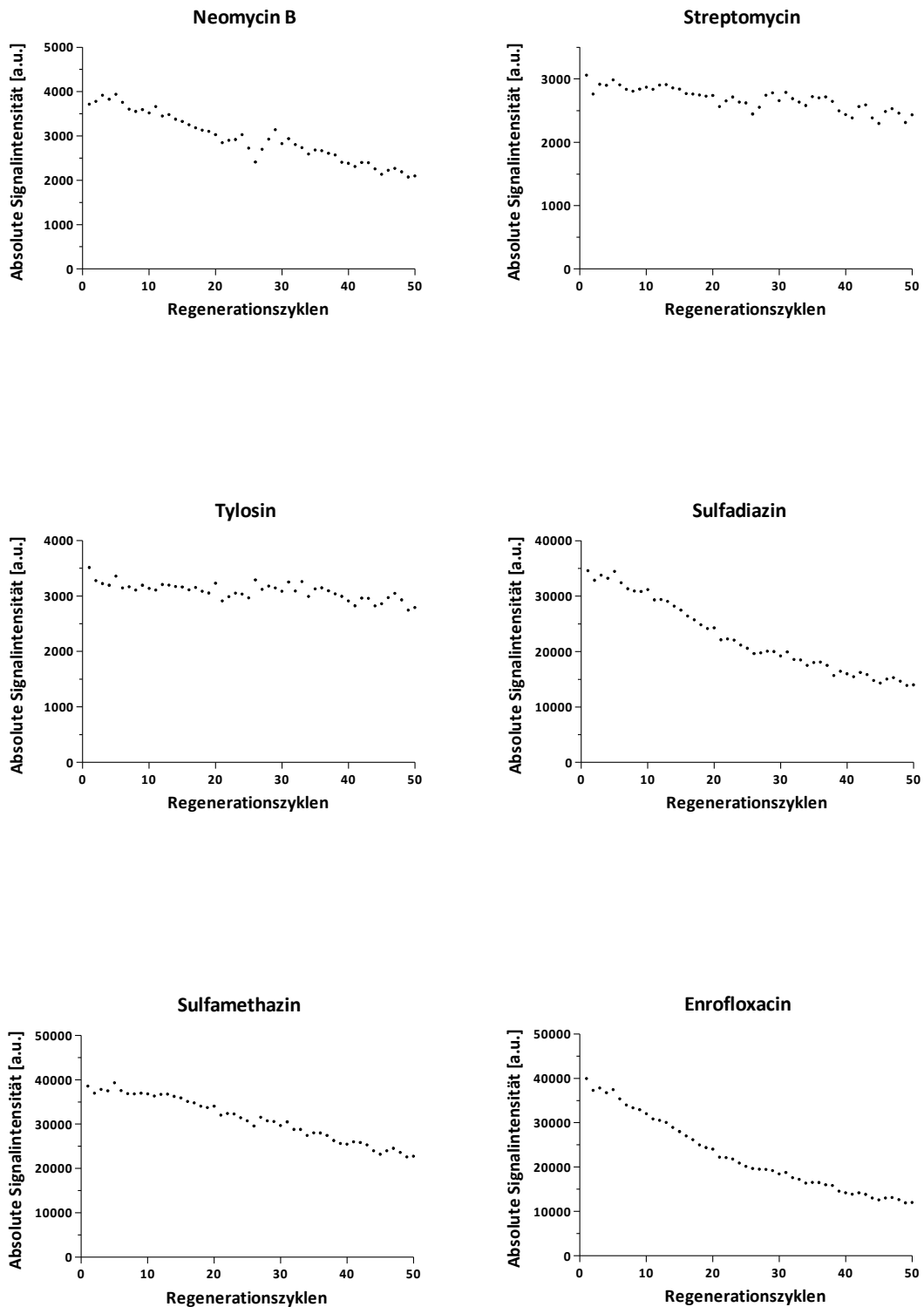
**Tabelle 7:** Reduktion der im Biosensor gemessenen relativen Signalintensität in Abhängigkeit von der Anzahl der Regenerationszyklen. Angegeben sind die relativen Restsignale mit dem jeweiligen Variationskoeffizienten (VK) nach 10, 30, 40 und 50 Regenerationszyklen. Als Probe wurde auf 4 verschiedenen Chips über je 50 Regenerationszyklen hemmstofffreier Caseinpuffer (1 % Casein/ PBS) eingesetzt.

Nachweis	Nach 10 Zyklen		Nach 30 Zyklen		Nach 40 Zyklen		Nach 50 Zyklen	
	Restsignal	VK	Restsignal	VK	Restsignal	VK	Restsignal	VK
Penicillin G	<b>92%</b>	6%	<b>74%</b>	10%	<b>64%</b>	10%	<b>64%</b>	26%
Cloxacillin	<b>81%</b>	13%	<b>54%</b>	11%	<b>49%</b>	16%	<b>47%</b>	19%
Nafcillin	<b>88%</b>	15%	<b>54%</b>	12%	<b>42%</b>	15%	<b>41%</b>	23%
Cephapirin	<b>58%</b>	17%	<b>29%</b>	20%	<b>22%</b>	17%	<b>21%</b>	28%
Ceftiofur	<b>75%</b>	23%	<b>56%</b>	27%	<b>46%</b>	25%	<b>40%</b>	11%
Gentamicin	<b>75%</b>	14%	<b>38%</b>	11%	<b>31%</b>	14%	<b>31%</b>	28%
Neomycin B	<b>89%</b>	17%	<b>68%</b>	15%	<b>58%</b>	21%	<b>54%</b>	15%
Streptomycin	<b>94%</b>	11%	<b>87%</b>	11%	<b>81%</b>	9%	<b>86%</b>	13%
Tylosin	<b>98%</b>	12%	<b>99%</b>	23%	<b>84%</b>	9%	<b>85%</b>	11%
Sulfadiazin	<b>81%</b>	14%	<b>45%</b>	19%	<b>40%</b>	17%	<b>40%</b>	20%
Sulfamethazin	<b>90%</b>	12%	<b>58%</b>	23%	<b>52%</b>	27%	<b>51%</b>	25%
Enrofloxacin	<b>82%</b>	15%	<b>44%</b>	8%	<b>34%</b>	12%	<b>33%</b>	15%
Negativkontrolle	<b>101%</b>	11%	<b>98%</b>	7%	<b>100%</b>	11%	<b>100%</b>	12%





**Abbildung 10:** Abfall der Messsignale für die verschiedenen auf den Microarray-Chip implementierten Antibiotikanachweise für Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur und Gentamicin. Dargestellt sind die im Laufe von 50 vollständigen Messzyklen erhaltenen Signale für einen antigenfreien Verdünnungspuffer.



**Abbildung 11:** Abfall der Messsignale für die verschiedenen auf den Microarray-Chip implementierten Antibiotikanachweise für Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Enrofloxacin. Dargestellt sind die im Laufe von 50 vollständigen Messzyklen erhaltenen Signale für einen antigenfreien Verdünnungspuffer.

### 1.3 Spezifität

Neben der Fähigkeit, Hemmstoffe unterhalb der rechtlich vorgeschriebenen Grenzwerte nachweisen zu können, ist die Bandbreite der nachweisbaren Substanzen von entscheidender Bedeutung für ein Screeningverfahren. Um eindeutige Aussagen zum abgedeckten Hemmstoffspektrum zu ermöglichen, wurden die Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper ermittelt. Die Versuche zu Kreuzreaktionen fokussierten sich zuallererst auf die Gruppe der Chinolone, da für den hierbei eingesetzten Antikörper in früheren Untersuchungen im Mikrotiterplattenformat generische Eigenschaften festgestellt worden waren (Acaröz, 2015). Die Kreuzreaktivität des mAk wurde mit dem MCR3-Biosensor überprüft, indem für alle MRL-belegten Chinolone 7-Punkt-Standardkurven in Pufferlösung (0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS) gemessen wurden und die Kreuzreaktionen relativ zur Detektion von Enrofloxacin anhand der  $IC_{50}$ -Werte bestimmt wurden. Die Kreuzreaktionen des mAk für Chinolone sowie die Testmittelpunkte und MRLs sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Kreuzreaktionen (CR) des Chinolon-Antikörpers. Alle 7 Standardlösungen wurden in Puffer (0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS) gemessen und mit der integrierten Analysesoftware des Biosensors ausgewertet. Die Kreuzreaktionen im klassischen Mikrotiterplattenformat (EIA) wurden von Acaröz ermittelt (Acaröz, 2015).

Kreuzreaktivität mit	MRL in Muskulatur	EIA CR	Biosensor	
			CR	$IC_{50}$
Marbofloxacin	150 µg/kg	106%	116%	0,58 µg/l
Ciprofloxacin	100 µg/kg <sup>1</sup>	17%	101%	0,67 µg/l
<b>Enrofloxacin</b>	<b>100 µg/kg <sup>1</sup></b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>0,68 µg/l</b>
Danofloxacin	100 µg/kg <sup>2</sup>	53%	98%	0,70 µg/l
Flumequin	200 µg/kg	23%	81%	0,84 µg/l
Difloxacin	200 µg/kg	18%	67%	1,01 µg/l
Oxolinsäure	100 µg/kg	18%	65%	1,05 µg/l
Sarafloxacin	10 µg/kg <sup>3</sup>	4%	22%	3,12 µg/l

<sup>1</sup> Summe Enrofloxacin und Ciprofloxacin

<sup>2</sup> 100 µg/kg für Schwein, 200 µg/kg für Rind

<sup>3</sup> MRL nur für Hähnchenfleisch

Mit Ausnahme von Sarafloxacin, für das nur in Muskulatur von Geflügel ein Rückstandshöchstwert festgelegt ist, liegen die Testmittelpunkte für alle Chinolone in der Biosensoranalyse sehr deutlich (Faktor 95 oder mehr) unterhalb des jeweiligen MRLs. Durch den Einsatz des gruppenspezifischen Antikörpers im Biosensor ist somit die gesamte Bandbreite der von der EU reglementierten Chinolone vollständig analytisch abgedeckt.

Wahrscheinlich bedingt durch die im Vergleich zur Mikrotiter-Platte unterschiedliche Testdurchführung im Biosensor – insbesondere durch die in C.5 beschriebene Vorinkubation der Antikörper mit der Probe, sowie das eingesetzte Durchflussprinzip für die Messung unter kompetitiven Bedingungen – konnte eine eindeutige Steigerung der Kreuzreaktivitäten im Vergleich zu den von Acaröz (2015) angegebenen Werten festgestellt werden. Insbesondere für die Wirkstoffe Ciprofloxacin, Flumequin, Difloxacin und Oxolinsäure, bei denen im klassischen Mikrotiterplattenformat Kreuzreaktionen im Bereich von 17 – 23 % ermittelt wurden, lagen die Werte im Biosensor mit 65 – 101 % deutlich höher. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden auch für die anderen im Biosensor verwendeten Antikörper in orientierenden Versuchen entsprechende Messungen durchgeführt. Eingesetzt wurden hierbei nur solche Wirkstoffe, für die zum einen bereits in früheren Untersuchungen eine Kreuzreaktivität mit einem der implementierten Antikörper festgestellt worden war und die zum anderen für die Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren zugelassen sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst, bei den Antikörpern wurde – mit Ausnahme des Nachweises von Dihydrostreptomycin – jedoch keine eindeutige Steigerung der Kreuzreaktivitäten festgestellt.

**Tabelle 9:** Relevante Kreuzreaktionen der für die Biosensor-basierten Analysen eingesetzten Antikörper. Die Kreuzreaktionen im Biosensor wurden in orientierenden Versuchen in Puffer (0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS) ermittelt. Die Werte für die unter klassischen EIA-Bedingungen im Mikrotiterplattenformat ermittelte Kreuzreaktivität der mAk stammen aus früheren am Lehrstuhl durchgeführten Untersuchungen.

<b>Antikörper gegen</b>	<b>Bekannte Kreuzreaktivität mit</b>	<b>Klassischer EIA CR</b>	<b>Biosensor CR</b>
Penicillin G	-		
Cloxacillin	Oxacillin	11%	12%
	Dicloxacillin	330%	97%
Nafcillin	-	-	
Cephapirin	-	-	
Ceftiofur	Cefquinom	22%	n.d. <sup>1</sup>
	Desfuroylceftiofur	35%	n.d. <sup>1</sup>
Gentamicin	-	-	
Neomycin B	-	-	
Streptomycin	Dihydrostreptomycin	63%	121%
Tylosin	Tilmicosin	13%	5%
	Tylvalosin	38%	30%
Sulfamethazin	Sulfamerazin	3%	3%
Sulfadiazin	Sulfamerazin	16%	24%
	Sulfathiazol	18%	13%

<sup>1</sup> n.d., nicht durchgeführt

## ***2 Adaption an die Probenmatrix Fleisch***

Da der Biosensor bislang nur für die Probenmatrix Milch validiert worden war, wurde im Folgenden der Einfluss der Probenmatrix Fleisch auf einige wesentliche Testparameter überprüft. Ein praxistaugliches Screeningverfahren muss in der Lage sein, eine hohe Anzahl von Proben schnell und günstig zu analysieren. Um eine möglichst einfache, schnelle, kostengünstige und geräteunabhängige Probengewinnung und –aufarbeitung zu realisieren, wurde Fleischsaft von Rind und Schwein mit jeweils drei verschiedenen Methoden (Einfrieren, Pressen oder Zentrifugation) gewonnen.

Als Proben für die Hemmstoffuntersuchung aus Fleischsaft werden üblicherweise Teile des muskulären Anteils des Zwerchfells verwendet, da eine Entnahme aus dieser stark durchbluteten Muskelpartie zum einen keine Wertminderung des Schlachttierkörpers bedeutet, zum anderen dieses Muskulaturstück auch bei anderen Untersuchungen eingesetzt wird (Trichinenschau, Salmonellenscreening). Die Probennahme kann also ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand bei der Schlachtung durchgeführt werden.

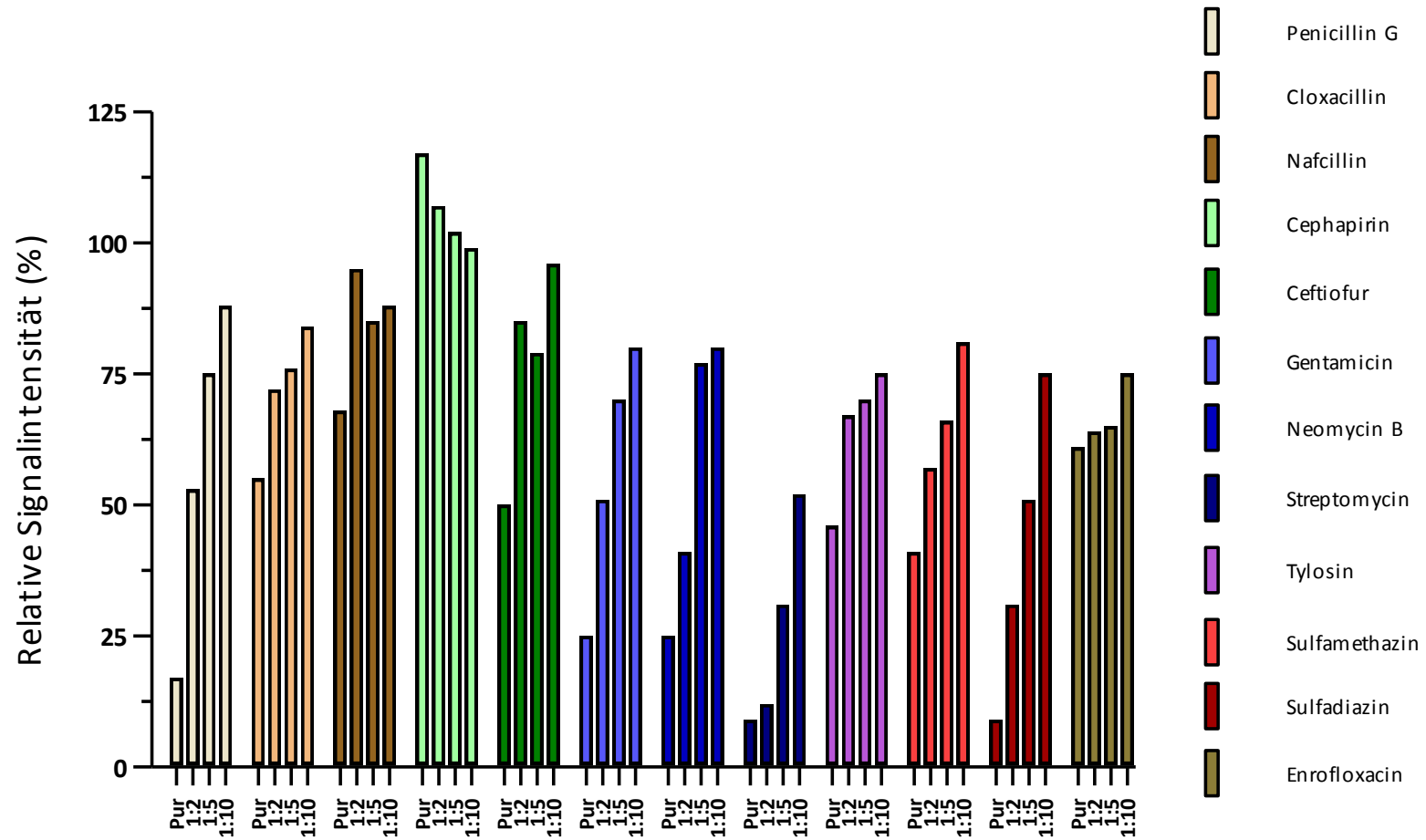
Für die Analyse im Biosensorsystem wird mindestens 1 ml Probenvolumen benötigt. Unter Berücksichtigung der für die Analysen notwendigen Verdünnung (D.3.1) in PBS reicht daher für die Untersuchung ein reines Fleischsaftvolumen von ca. 0,2 ml aus. Um Fleischsaft in dieser Größenordnung aus der Muskulatur zu gewinnen, erwiesen sich alle drei getesteten Methoden als praktikabel:

- Bei der Gefriermethode wurden Fleischproben von ca. 20 g eingefroren und in einem Trichter bei 4 °C über Nacht aufgetaut. Hierbei war es wichtig, die Proben von Faszien zu befreien, da diese das Austreten von Flüssigkeit verhindern können. Aus einer Probe von 20 g Muskulatur konnten mit dieser Methode etwa 1,1 – 3,8 ml Fleischsaft gewonnen werden.
- Bei der Pressmethode wird frische Muskulatur zwischen Plexiglasscheiben oder in einer Knoblauchpresse gequetscht bis Flüssigkeit austritt. Die Ausbeute beträgt dabei für 20 g etwa 3,2 – 5,0 ml.
- Bei der Zentrifugemethode werden Muskulaturstücke á 20 g für 10 Minuten bei 10.000 × g zentrifugiert, dabei treten aus der Fleischprobe etwa 2,2 – 3,8 ml Saft aus.

## ***2.1 Einfluss der Verdünnung***

Um eventuelle Probenmatrixeffekte des mit verschiedenen Methoden gewonnenen Fleischsaftes zu untersuchen, wurde der gewonnene Saft direkt bzw. 1:2, sowie 1:5 und 1:10 in PBS verdünnt gemessen. Die dabei erhaltenen Messsignale wurden in Relation zu direkt davor bzw. danach gemessenem Puffer (1 % Casein/PBS) gesetzt. Am Beispiel eines mittels Einfrier-Methode gewonnenen Fleischsaftes vom Schwein sind die Effekte bei den jeweiligen Antibiotika-Nachweisen in Abbildung 12 dargestellt (n = 6 Messungen je Verdünnungsstufe, dargestellt ist jeweils der Mittelwert).

Für alle Tests ging der Einfluss der Matrix mit zunehmender Verdünnungsstufe zurück, jedoch war der Effekt, sowohl der Matrix selbst, als auch der Verdünnungsstufe auf die einzelnen Hemmstoffnachweise unterschiedlich stark: Prinzipiell konnte bei allen Einzeltests – mit Ausnahme des Cephapirin-Nachweises – eine deutliche, Probenmatrix-abhängige Reduktion des Messsignals beobachtet werden. Die Reduktion bewegte sich für den unverdünnt eingesetzten Fleischsaft im Bereich von 32 % (Nafcillin) bis 91 % (Streptomycin), deutlich geringere Werte wurden für den 1:5 verdünnten Fleischsaft (Reduktion um 15 – 69 %) erhalten. Allerdings lag das relativ zum Referenzpuffer (1 % Casein/PBS) gemessene Signal beim Streptomycinnachweis für hemmstofffreien Fleischsaft auch bei der höchsten getesteten Verdünnungsstufe von 1 : 10 noch deutlich niedriger (52 % des Signals), purer oder 1:2 verdünnter Saft führten gar zu einer Signalreduktion von 91 % bzw. 88 %. Beim Test für Cephapirin dagegen zeigte sich nur ein geringer Einfluss der Matrix, die Messergebnisse lagen hier auch für pur eingesetzten Fleischsaft im gleichen Bereich wie für 1 % Casein/PBS.



**Abbildung 12:** Einfluss der Probenmatrix eines hemmstofffreien Fleischsaftes in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die im Biosensor gemessenen Signalintensitäten bei den jeweiligen Einzelnachweisen (n = 6 pro Verdünnungsstufe). Die Messergebnisse sind als Relativwerte angegeben, die für den Referenzpuffer (1% Casein/PBS) erhaltenen Signale wurden dabei gleich 100 % gesetzt.



Für die verdünnten Fleischsaftproben konnten zudem für die jeweiligen Einzelnachweise zwei verschiedene Beobachtungen gemacht werden: Während die Tests für Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur, Tylosin und Enrofloxacin auch höhere Probenmatrixkonzentrationen tolerierten – die Signalintensitäten zwischen den 1:2 und 1:10 verdünnten Proben unterschieden sich um weniger als 15 % –, traten bei Penicillin, Gentamicin, Neomycin B, Streptomycin und Sulfadiazin mit zunehmender Verdünnung deutlich geringere Matrixeffekte auf.

Grundsätzlich zeigten die Versuche zum Einfluss der Probenmatrix, dass Fleischsaft ohne aufwändige (chemische) Extraktionsmethoden im Biosensor analysiert werden kann, wobei jedoch eine Verdünnung in PBS von mindestens 1:5 nötig ist, um nachweisübergreifend Matrixeffekte auf ein akzeptables Niveau zu reduzieren.

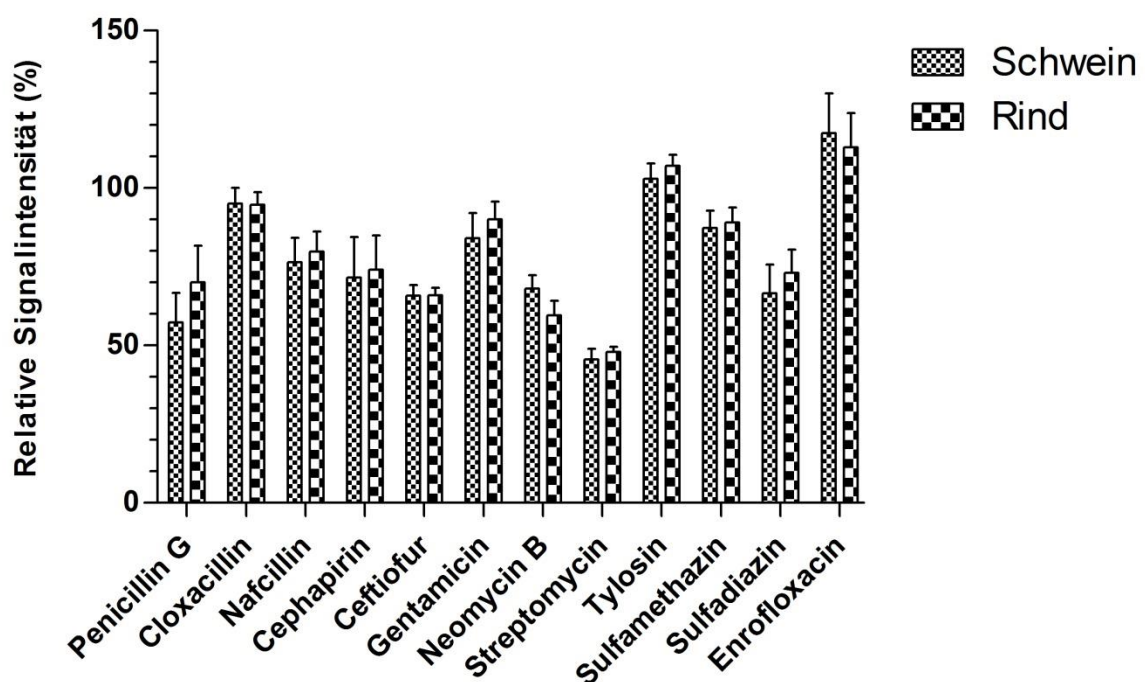
## ***2.2 Auswahl eines Referenzpuffers***

Da Fleischsaft (1:5 in PBS verdünnt) auf die einzelnen Hemmstoffnachweise unterschiedlich starke Auswirkungen zeigte – die erhaltenen relativen Signalintensitäten reichten von ca. 30 % beim Streptomycinnachweis bis zu etwa 100 % beim Cephapirintest (Abbildung 12) – wurden verschiedene alternative Referenzpuffer überprüft, die besser geeignet sein sollten, die Matrix Fleischsaft zu simulieren. Zu diesem Zweck wurden in orientierenden Versuchen verschiedene Konzentrationen von Casein und BSA (jeweils verdünnt in PBS-Puffer), sowie Mischungen dieser beiden Proteine, untersucht. Die Signalintensitäten für die einzelnen Hemmstoffnachweise zeigten dabei unterschiedliche Reaktionen auf die verschiedenen getesteten Referenzpuffer: Die relative Signalintensität von verdünntem Fleischsaft zu in PBS gelöstem BSA lag für die Einzelnachweise Penicillin G, Neomycin B und Ceftiofur geringgradig, für Cephapirin deutlich niedriger als zu Caseinpuffer der gleichen Konzentration. Ein entgegengesetztes Bild zeigten die Antibiotikaspots für Cloxacillin, Streptomycin, Tylosin, beide Sulfonamide sowie Enrofloxacin: Die relative Signalintensität von Fleischsaftproben zu BSA-Puffer war – für Tylosin und Enrofloxacin sehr deutlich – höher als die zu Caseinpuffer. Für den Nafcillin-Nachweis hatten die verschiedenen Zusätze keine Auswirkung. Als geeignetste Konzentration für den Referenzpuffer erwies sich letztlich ein Proteingehalt von 0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS. Mit diesem Puffer als Referenz lag das geringste relative Signal (Streptomycinspot) bei der Analyse von Fleischsaft (bei einer

Verdünnung von 1:5) bei ca. 50 %, das höchste (Enrofloxacin-Nachweis) bei ca. 120 % (Abbildung 13).

### 2.3 Einfluss der Tierart und der Probenbehandlung

Um zu untersuchen, ob sich der Fleischsaft von Rind und Schwein unterschiedlich auf die Ergebnisse der Biosensoranalyse auswirkt, wurden jeweils 20 Saftproben (jeweils 10 mittels Einfrier- bzw. Pressmethode gewonnen) 1:5 in PBS verdünnt und gemessen. Die absoluten Chemilumineszenzsignale wurden in Relation zu Messungen des Referenzpuffers (0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS) gesetzt. Wie in Abbildung 13 gezeigt, konnte Tierart-abhängig kein signifikanter Einfluss auf die Messergebnisse festgestellt werden. Auch für die unterschiedlich gewonnenen Fleischsäfte waren keine auffälligen Unterschiede zu beobachten, auf eine differenzierte Darstellung der beiden Probenpools wurde daher verzichtet.

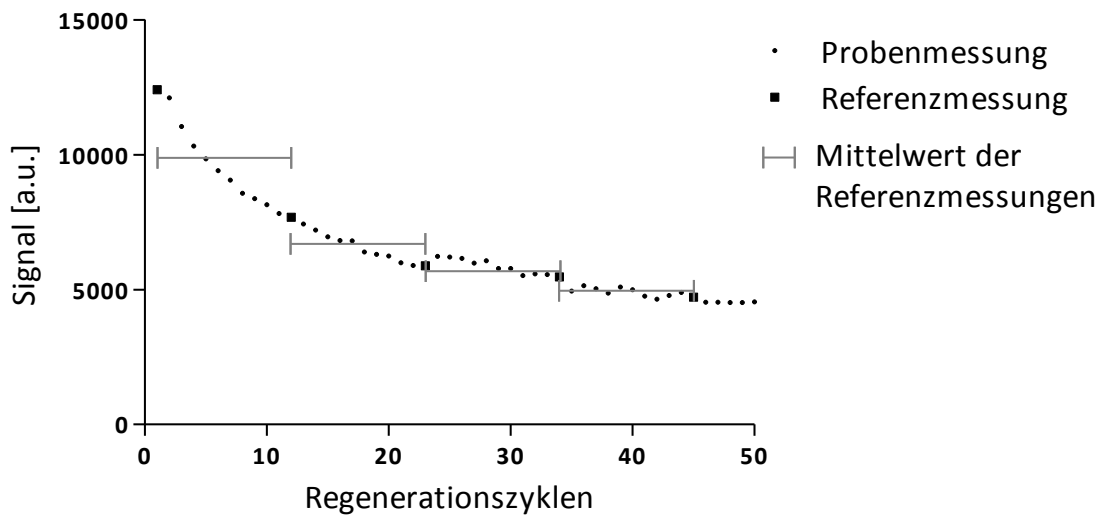


**Abbildung 13:** Vergleich der Matrixeffekte für Fleischsaft von Rind und Schwein (n = 20 pro Tierart). Der Fleischsaft wurde jeweils zur Hälfte durch Einfrieren und durch Pressen gewonnen. Die Messergebnisse sind relativ zum Referenzpuffer (0,6 % BSA und 0,4 % Casein in PBS) dargestellt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Hinblick auf die weitere Etablierung des Screeningverfahrens das Messsystem sowohl für Rind und Schwein als auch für die beiden getesteten Methoden zur Fleischsaftgewinnung parallel validiert werden.

#### ***2.4 Ausgleichen der Signalverringering***

Um trotz der Verringerung des absoluten Messsignals (Abschnitt D.1.2) eine zuverlässige und reproduzierbare qualitative Analyse von Fleischproben mit dem Biosensor zu realisieren, wurden Referenzmessungen jeweils vor bzw. nach einem Block von zehn Probenmessungen durchgeführt; die Messwerte der zehn Proben wurden dann zum Mittelwert der beiden Referenzmessungen in Relation gesetzt, um so die systemimmanente Signalreduktion näherungsweise auszugleichen. Mit Einführung der Referenzmessungen wird der Fehler durch die Signalreduktion insgesamt vermindert, jedoch werden die Resultate der ersten Hälfte eines Zehnerblocks dadurch etwas über-, die der zweiten unterschätzt.



**Abbildung 14:** Referenzmessungen wurden genutzt, um den durch Signalverringern entstehenden Fehler zu verringern (dargestellt am Beispiel des Cloxacillin-Nachweises). Im dargestellten Beispiel wurden 50 Messzyklen unter Verwendung eines antigenfreien Probenpuffers durchgeführt. Die Auswertung der Proben erfolgt als 10er-Block, wobei die jeweils vor bzw. nach diesem Analyseblock gemessenen Werte für den Referenzpuffer gemittelt und als Referenzwert zur Bestimmung eines Signalabfall-bereinigten Leerwertes (= 100 %) verwendet wurden. Die ersten 3 Messungen (Vorspülen mit Laufpuffer) werden nicht in die Messung mit einbezogen und sind nicht dargestellt.

Wie am Beispiel des Cloxacillin-Nachweises (der in den ersten Messzyklen den stärksten Signalabfall aufweist, resultierend in einem Restsignal von 50 % nach weniger als 20 Messungen) in Abbildung 14 gezeigt, verringert sich der Fehler im Lauf der Messzyklen: Während die Werte der Probenmessungen beim ersten Zehnerblock relativ zum Referenzpuffer von 120 % (erste Messung) bis 78 % (zehnte Messung) reichen, verringert sich die Abweichung in weiteren Zyklen auf unter 10 Prozentpunkte.

Trotz der Reduzierung des Messfehlers durch den Einsatz von Referenzmessungen zeigte sich eine hohe Standardabweichung der Messungen. Dies gilt insbesondere für Signalverläufe, die in den ersten Messungen deutlich abfallen (Nachweise von Cloxacillin und Cephapirin). Für alle folgenden Untersuchungen wurden die Chips deshalb zunächst dreimal mit Laufpuffer vorgespült und regeneriert, was die deutlichsten Signalreduktionen abfing,

bevor die eigentlichen Messreihen gestartet wurden.

Für die im Folgenden dargestellten Versuchsreihen zur Validierung des Biosensors für die Probenmatrix Fleisch erfolgte die Kalkulation der relativen Signalwerte für die in einem Zehnerblock untersuchten Proben nach der Formel:

$$Sr(\%) = \frac{S}{(b1+b2)/2} \times 100$$

Dabei ist: Sr das relative Signal der Probe, S das absolute Signal der Probe, b1 und b2 die absoluten Signale des Referenzpuffers vor und nach einer Gruppe von zehn Proben.

### ***3 Validierung***

Basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen der Evaluierung des Verfahrens sowie der Adaption und Optimierung für die Matrix Fleisch wurde die Biosensor-basierte Screeningmethode entsprechend den in der EU-Richtlinie EG Nr.657/2002 definierten Kriterien als qualitatives Analyseverfahren validiert. Diese Prozedere bedingte zum einen die Festlegung der jeweiligen Rückstandsmenge (Zielkonzentration), für die das Verfahren validiert werden sollte, sowie im weiteren die auf umfangreichen Experimenten beruhende Definition der Entscheidungsgrenzen (Cut-Off-Werte) für die einzelnen Hemmstoffnachweise. Zusätzlich zu diesem Validierungsschritt wurde die praktische Anwendbarkeit des Screenings im Hinblick auf Probenvorbereitung und Bedienungsfreundlichkeit bewertet. Um die Richtigkeit der neu entwickelten Untersuchungsmethode abschließend zu testen, wurden bei Routineuntersuchungen angefallene, „natürlich gewachsene“ hemmstoffhaltige Fleischproben mit dem Biosensorscreening analysiert und die Korrelation der Ergebnisse mit den zu den Proben vorhandenen LC/MS-MS Daten ermittelt.

#### ***3.1 Auswahl der Zielkonzentrationen und Verdünnungsstufe***

Die Auswahl der Zielkonzentrationen für die zu entwickelnde Screeningmethode basierte auf den Ergebnissen der Evaluierungsphase. Die Vorversuche zur Empfindlichkeit der Einzelnachweise ergaben, dass der Test für Cephapirin ( $IC_{50}$  in 1 % Caseinpuffer = 10,0  $\mu\text{g/l}$ ) im Bezug zu den festgelegten Rückstandshöchstmengen (MRL in Muskulatur vom Rind = 50  $\mu\text{g/kg}$ ) den geringsten analytischen Spielraum aufwies. Im Hinblick auf eine erforderliche Verdünnung der Proben von mindestens 1:5 (D.2.1) und bei Berücksichtigung der ermittelten Testempfindlichkeiten (D.1.1) wurden als Zielkonzentrationen zunächst für jedes Antibiotikum der halbe MRL gewählt; waren dotierte Proben mit dieser Konzentration nicht eindeutig von hemmstofffreiem Fleischsaft zu unterscheiden, wurde der Versuch mit einer höheren Konzentration wiederholt. Für Einzelnachweise, deren Empfindlichkeit deutlich niedriger lag als ein Zehntel der jeweiligen Rückstandshöchstmenge, wurden außerdem weitere Dotierungsversuche unternommen, um die kleinste, sicher nachweisbare Konzentration ( $CC\beta$ ) zu ermitteln.

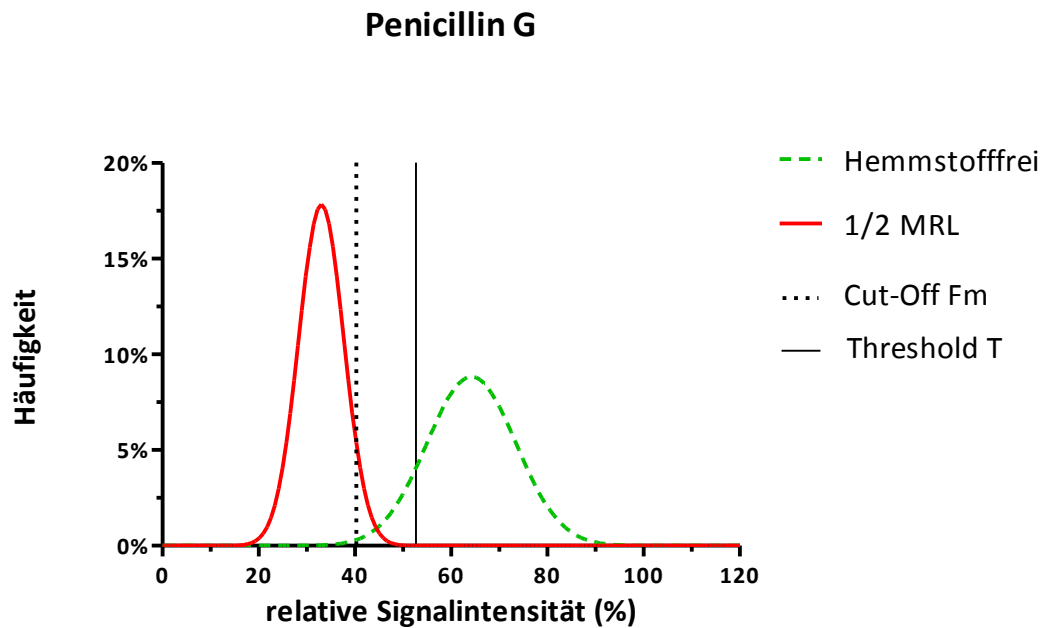
### ***3.2 Ermittlung der Cut-off Werte***

Die Validierung von Screeningmethoden fokussiert sich in erster Linie auf die sichere Unterscheidung von positiven und negativen Proben. Im Biosensor erfolgt diese Diskriminierung anhand der relativen Signalintensitäten von dotiertem und undotiertem Fleischsaft. Als entscheidender Wert dient dabei der – für jedes Antibiotikum individuell zu ermittelnde – Cut-Off-Wert  $F_m$ . Dieser Wert, errechnet aus den Messwerten von jeweils mindestens 20 auf Validierungsniveau dotierten Proben, repräsentiert diejenige relative Signalintensität, die von maximal 5 % der dotierten Proben überschritten wird. Liegt der Cut-Off-Wert unterhalb des Mittelwertes der hemmstofffreien Proben, können mit dem Testsystem prinzipiell dotierte Proben identifiziert werden; liegt er unterhalb von  $T$  (dem relativen Signal, das von maximal 5 % der hemmstofffreien Proben unterschritten wird), ist zudem die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse geringer als 5 %. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die im Rahmen der Validierungsstudie ermittelten Werte im Folgenden als Standardverteilungskurven dargestellt: Überschneiden sich die Kurven von dotierten und undotierten Proben deutlich, so ist das Screening für die untersuchte Konzentration nicht geeignet und muss mit einer höheren Konzentration wiederholt werden. Schneidet die Kurve für hemmstofffreien Fleischsaft den Cut-Off-Wert  $F_m$ , so ist mit falsch positiven Ergebnissen zu rechnen. Je weiter die Normalverteilungskurven auseinanderliegen, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Resultate; berühren sich die Kurven nicht, sind statistisch gesehen keine falsch-positiven Ergebnisse zu erwarten.

Für die Etablierung der einzelnen Cut-Off-Werte wurden jeweils mindestens 20 dotierte und 20 undotierte Proben gemessen; der Fleischsaft für die Analysen wurde aus Muskulatur von jeweils 20 einzelnen Tieren (je zur Hälfte Rind und Schwein) zu gleichen Teilen mittels Press- und Einfriermethode gewonnen. Die Versuche mit den gewählten Zielkonzentrationen für die einzelnen Hemmstoffe sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt, eine Zusammenfassung der ermittelten Cut-Off-Werte bzw. des Nachweisvermögens von Einzeltests ist in 3.2.7 dargestellt.

### 3.2.1 Penicilline

Benzylpenicillin, 1928 von Fleming als erstes Antibiotikum entdeckt, wird bis heute weit verbreitet eingesetzt. Der Wirkmechanismus beruht auf der Inhibition der Peptidoglycan-synthese, wodurch die Bildung von Murein (ein Peptidoglycan, das in Säugerzellen nicht vorkommt) gehemmt wird.



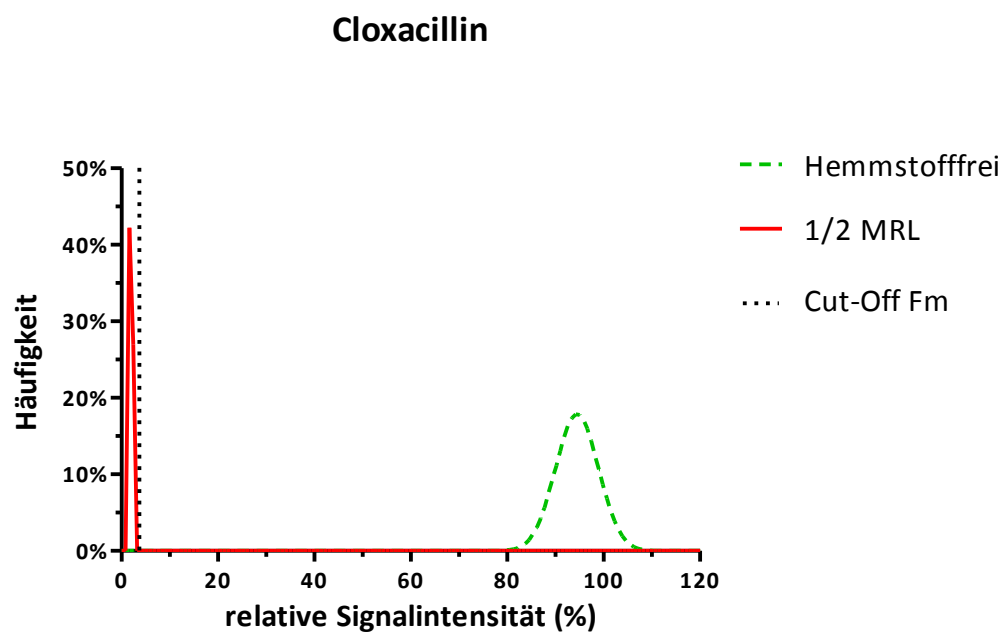
**Abbildung 15:** Validierung des Penicillin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Die Messergebnisse (relativ zum Referenzpuffer) von dotiertem und undotiertem Fleischsaft sind als Normalverteilungskurven dargestellt. Der Nachweis von Penicillin G ist auf halbem MRL-Niveau sicher möglich.

Der Nachweis von **Penicillin G** aus Fleischsaft im MCR3-Biosensor ist auf halbem MRL-Niveau (MRL = 50 µg/kg) sicher möglich, wobei aufgrund der geringfügigen Überschneidung der Normalverteilungskurve für hemmstofffreien Fleischsaft mit dem Cut-Off Fm (Abbildung 15) die minimale Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen besteht. Die erfolgreich validierte Rückstandsmenge, entsprechend dem halben MRL, war die kleinste getestete Konzentration, CC<sub>β</sub> für Penicillin G liegt demnach bei 25 µg/kg. Auffällig bei diesem Nachweis ist die vergleichsweise hohe Varianz der Messergebnisse für hemmstofffreien Fleischsaft, was in einer relativ breiten Normalverteilungskurve resultierte. Die ermittelten Messwerte



umfassten hierbei den Bereich von 54 – 79 %; für mit halben MRL dotierte Proben lagen sie zwischen 26 – 39 %.

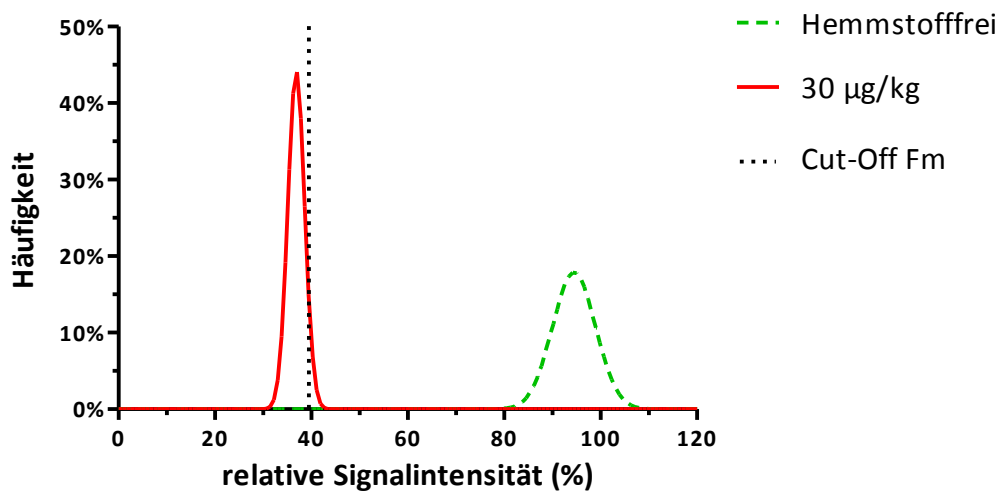
**Cloxacillin**, ein  $\beta$ -Lactamase-stabiles Antibiotikum aus der Familie der Penicilline, wird in Deutschland hauptsächlich in der Tiermedizin eingesetzt. Aufgrund der hohen intramammären Absorptionsrate wird es häufig zur Behandlung von Mastitiden verwendet.



**Abbildung 16:** Validierung des Cloxacillin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Der Nachweis auf halbem MRL-Niveau zeigt eine extrem deutliche Unterscheidung positiver und negativer Proben.

Die bei der Validierung des Cloxacillin-Nachweises auf halbem MRL-Niveau (MRL = 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in Fleischsaft erhaltenen Messdaten dokumentieren, dass im Biosensor aufgrund der hohen Sensitivität des Testverfahrens eine extrem deutliche Unterscheidung positiver von negativen Proben (Abbildung 16) möglich ist. Um die Empfindlichkeit des Cloxacillin-Nachweises detaillierter zu testen, wurde in einem weiteren Dotierungsversuch eine Rückstandskonzentration von 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (entspricht einem Zehntel des MRLs) untersucht. Auch hier ergab die Analyse von 20 dotierten Proben noch eine sehr deutliche Auftrennung dotierter von undotierten Proben (Abbildung 17).

## Cloxacillin

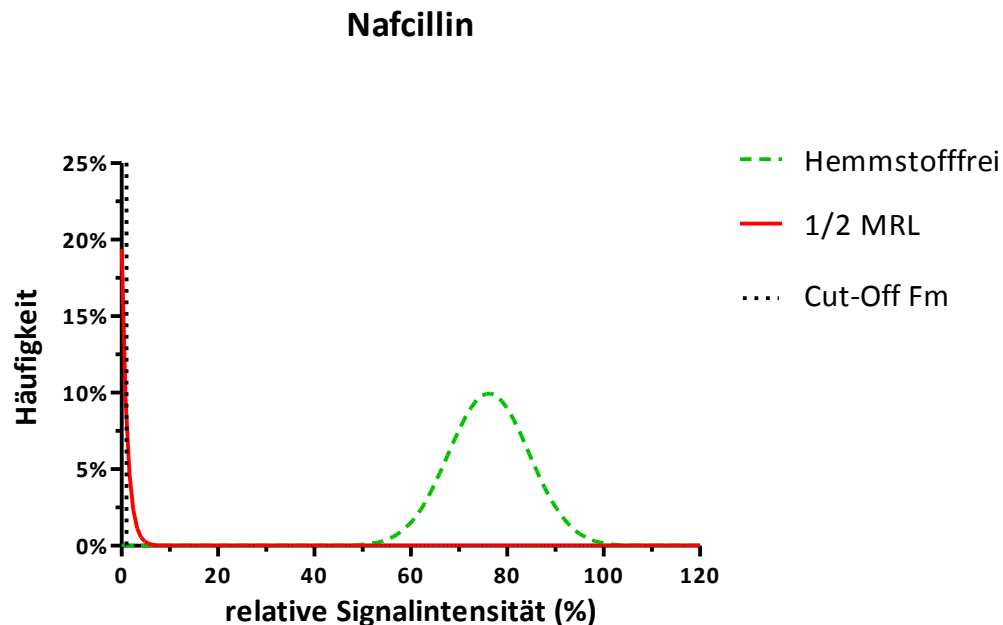


**Abbildung 17:** Validierung des Cloxacillin-Nachweises bei einer Dotierkonzentration von 30 µg/kg, entsprechend einem Zehntel des MRL. Auch bei dieser Rückstandskonzentration ist die Auftrennung noch sehr deutlich.

Da dies die niedrigste untersuchte Konzentration war, wurden 30 µg/kg als CC $\beta$  für den Cloxacillin-Nachweis definiert. Vermutlich ist aber – aufgrund der nach wie vor sehr deutlichen Auftrennung – mit diesem Einzelnachweis auch der sichere und reproduzierbare Nachweis von noch niedrigeren Rückstandskonzentrationen möglich.

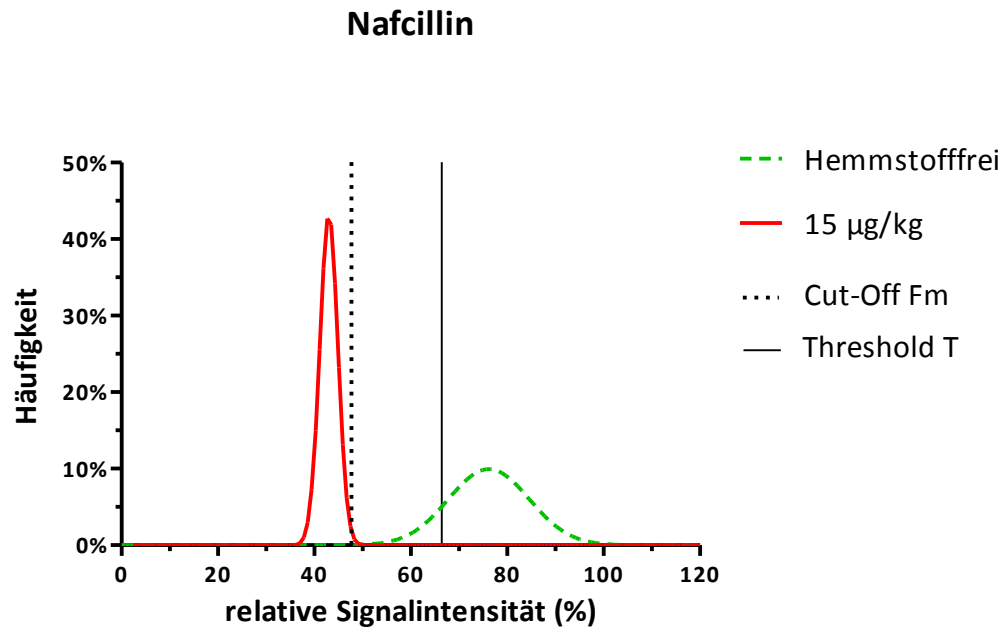
Zusätzlich zur Analyse von Cloxacillin-Rückständen können über Kreuzreaktionen des mAk auch Dixcloxacillin und Oxacillin detektiert werden. In orientierenden Versuchen (je 17 Messungen von mit ½ MRL dotiertem Fleischsaft) konnte gezeigt werden, dass diese Hemmstoffe ebenfalls sicher bei der halben Rückstandshöchstmenge erkannt werden (Tabelle 11). Die Cut-Off-Werte für den ½ MRL liegen bei 5,1 % (Dixcloxacillin) bzw. 34,1 % (Oxacillin), die entsprechenden Normalverteilungskurven sind im Anhang dargestellt.

**Nafcillin**, ein ebenfalls  $\beta$ -Lactamase-resistentes Penicillin, ist ein semisynthetisch hergestelltes  $\beta$ -Lactam Antibiotikum, das eine etwas höhere Säurestabilität als Penicillin und Cloxacillin aufweist.



**Abbildung 18:** Validierung des Nafcillin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Die Messergebnisse (relativ zum Referenzpuffer) von dotiertem und undotiertem Fleischsaft sind als Normalverteilungskurven dargestellt. Der Nafcillin-Nachweis bei halben MRL ist eindeutig.

Ähnlich wie der Nachweis von Cloxacillin ist der Nafcillin-Nachweis hochsensitiv: auf halbem MRL-Niveau dotierter Fleischsaft (MRL = 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in Rindfleisch; für Muskulatur vom Schwein ist kein MRL festgelegt) führt zu einer annähernd vollständigen Hemmung des Chemilumineszenzsignals. Dies ermöglicht eine eindeutige Identifizierung rückstandshaltiger Proben (Abbildung 18). Analysen von mit 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dotierten Fleischsaftproben (entspricht einem Zwanzigstel MRL) resultierten in näher beieinander liegenden Normalverteilungskurven (Abbildung 19), sind aber dennoch deutlich getrennt. Fm für die reduzierte Dotierungskonzentration beträgt 47,7 %, T liegt bei 66,4 %; der höchste für eine dotierte Probe (n = 20) gemessene Wert lag mit 47,0 % deutlich unterhalb von T. Das validierte Nachweisvermögen von Nafcillin liegt somit bei  $\text{CC}\beta = 15 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

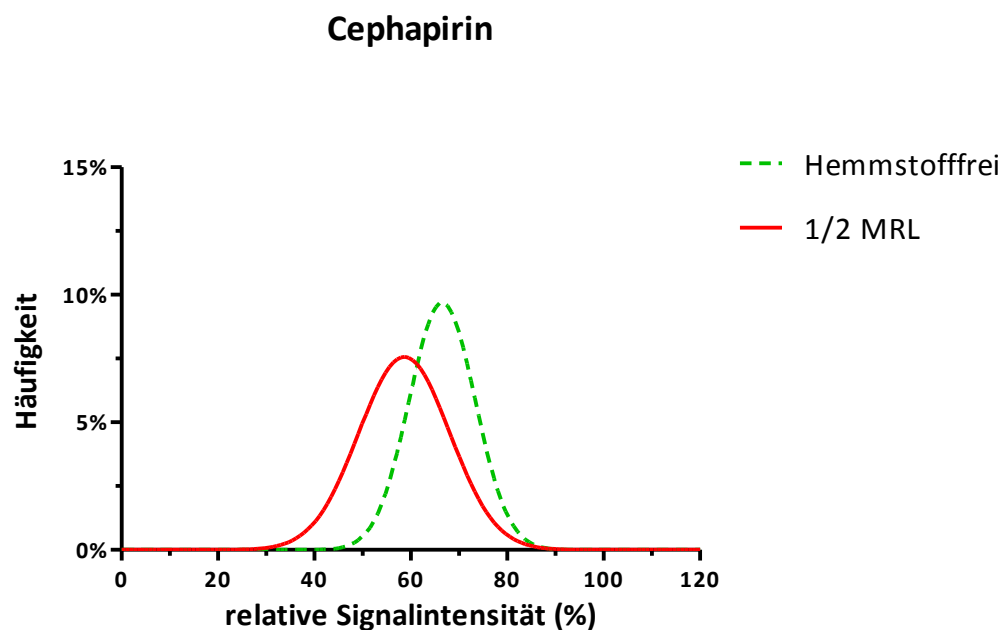


**Abbildung 19:** Validierung des Nafcillin-Nachweises bei einer Dotierungskonzentration von 15 µg/kg. Auch bei einer Rückstandskonzentration, die 20-fach unterhalb der rechtlichen Vorgaben liegt, werden hemmstoffhaltige Proben eindeutig identifiziert.

### 3.2.2 Cephalosporine

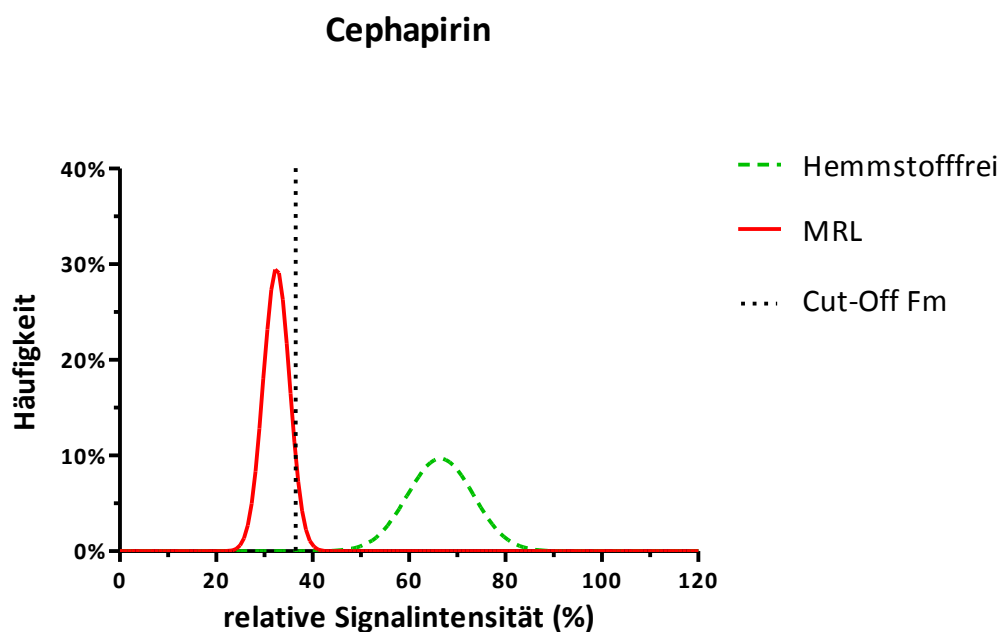
Als Penicillinase-stabiles Cephalosporin der ersten Generation wird Cephapirin gegen Staphylokokkeninfektionen und als Trockensteller eingesetzt.

Der **Cephapirinnachweis** zeigte in Vorversuchen die geringste Sensitivität ( $IC_{50}$  in Caseinpuffer = 10,0  $\mu\text{g/l}$ ). Daher war es nicht überraschend, dass für diesen Nachweis eine Validierung auf halbem MRL-Niveau (MRL in Muskulatur vom Rind = 50  $\mu\text{g/kg}$ ) nicht möglich war (Abbildung 20), hemmstoffhaltiger Fleischsaft konnte demnach nicht eindeutig von Negativproben differenziert werden. Die Normalverteilungskurven überschneiden sich deutlich, ein nach den in Richtlinie EG Nr.657/2002 definierten Kriterien festgelegter Cut-Off-Wert für positive Proben wäre weit innerhalb des Bereiches möglicher Werte für hemmstofffreie Proben zu liegen gekommen (bei 77,1 % relativer Signalintensität) – mit der Folge einer nicht vertretbar hohen Anzahl (ca. 3/4 aller hemmstofffreien Proben) von falsch-positiven Ergebnissen.



**Abbildung 20:** Validierung des Cephapirin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Die Unterscheidung von hemmstofffreien und hemmstoffhaltigen Proben ist bei einer Konzentration entsprechend dem  $\frac{1}{2}$  MRL nicht möglich.

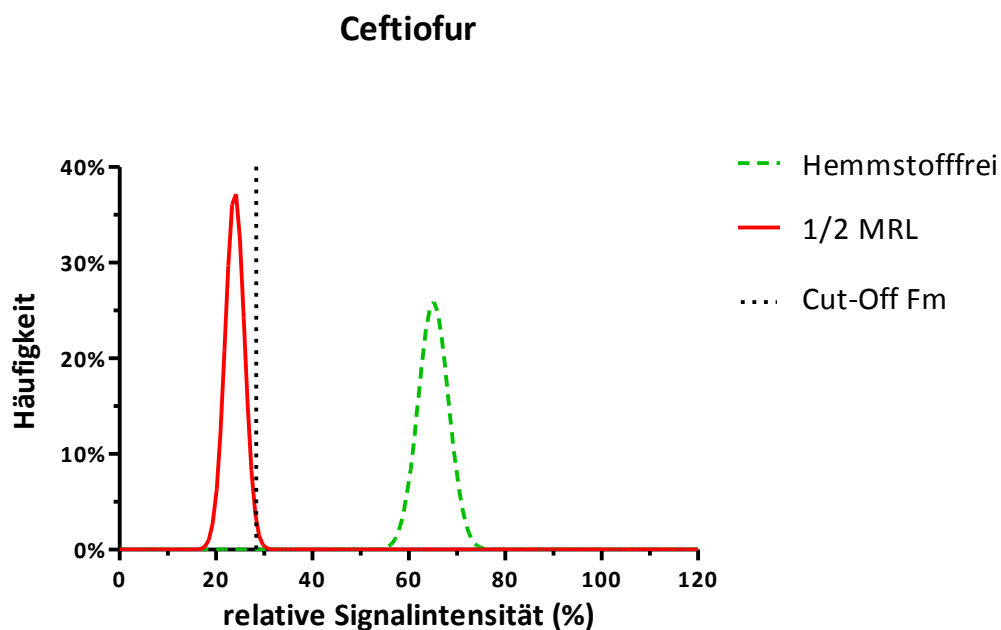
Um das Screeningverfahren dennoch für Cephapirin zu validieren, wurde die Zielkonzentration auf MRL-Niveau angehoben und der Versuch wiederholt: 40 Fleischsaftproben, dotiert mit 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Cephapirin wurden dafür analysiert. Bei der zweiten getesteten Konzentration (Abbildung 21) konnten die hemmstoffhaltigen Proben eindeutig als solche identifiziert werden, keine der hemmstofffreien Proben wurde als falsch-positiv eingestuft. Das Nachweisvermögen  $\text{CC}\beta$  für Cephapirin entspricht also dem für Muskulatur vom Rind vorgegebenen Rückstandshöchstwert von 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



**Abbildung 21:** Validierung des Biosensor-basierten Cephapirin-Nachweises auf MRL-Niveau. Bei der auf 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (MRL-Niveau) erhöhten Cephapirin-Konzentration ( $n = 40$  Messungen für dotierten Fleischsaft) überschneiden sich die Normalverteilungskurven von hemmstoffhaltigen und -freien Proben nicht.

**Ceftiofur** ist ein Cephalosporin der dritten Generation, das sich durch eine starke  $\beta$ -Lactamase-Stabilität sowie ein breites Wirkspektrum auszeichnet. Es wurde speziell für den Einsatz in der Tiermedizin entwickelt. Das Screening auf Ceftiofur-Rückstände wurde für den halben MRL (MRL = 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) validiert).

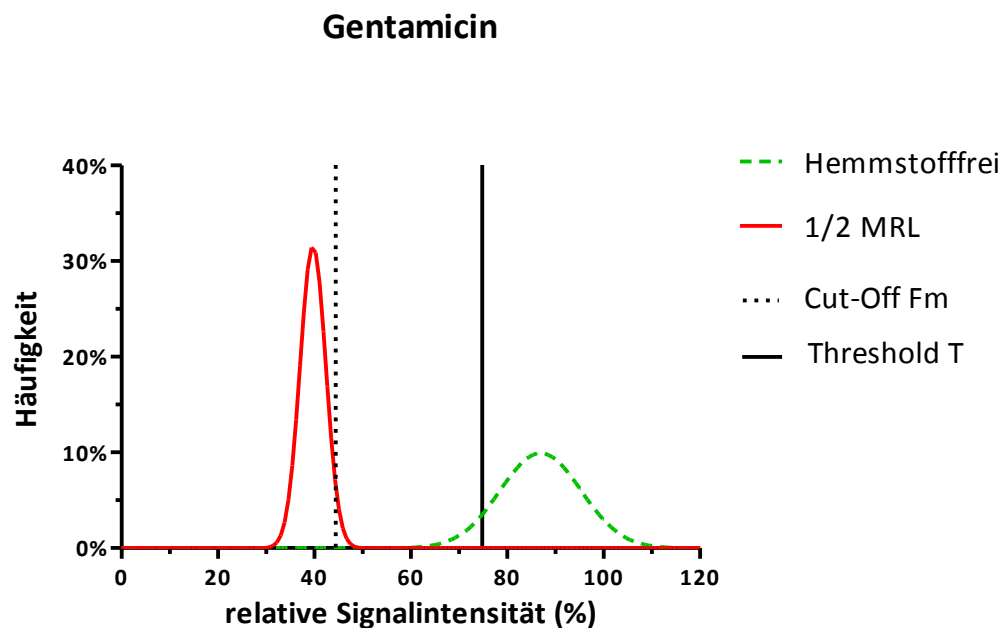
Dass trotz der ausgezeichneten Empfindlichkeit des Tests für Ceftiofur ( $\text{IC}_{50}$  in Caseinpuffer = 0,9  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) keine deutlichere Trennung der beiden Normalverteilungskurven für hemmstofffreie und dotierte Fleischsaftproben (Abbildung 22) erhalten wurde, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass grundsätzlich für diesen Nachweis sehr geringe Signalintensitäten im Biosensor generiert werden. Die in Abbildung 22 dargestellten relativen Signale für dotierte Proben entsprechen daher eigentlich einer vollständigen Hemmung. Da der Ceftiofur-Spot zusätzlich die geringste Lagerungsstabilität aufwies (Abschnitt D.3.3.4) konnten keine Versuche mit geringeren Dotierungskonzentrationen durchgeführt werden. Bis zu weiteren Versuchen gilt demnach die einzige untersuchte Konzentration von Ceftiofur gleichzeitig als deren Nachweisvermögen  $\text{CC}\beta$  (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



**Abbildung 22:** Validierung des Ceftiofur-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Die Messergebnisse (relativ zum Referenzpuffer) von dotiertem und undotiertem Fleischsaft sind als Normalverteilungskurven dargestellt.

### 3.2.3 Aminoglykoside

**Gentamicin**, das aus einem Gemisch strukturell sehr ähnlicher Aminoglycosidverbindungen besteht, bindet an die 30-S Untereinheit bakterieller Ribosome (vor allem bei gramnegativen Bakterien) und behindert so das Ablesen von mRNA und folglich die Proteinbiosynthese.

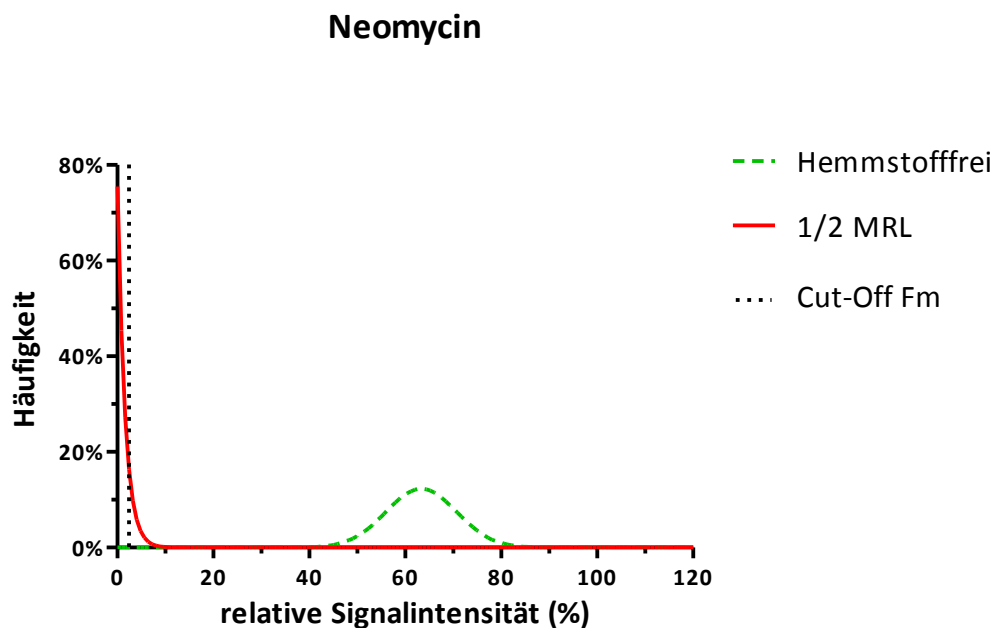


**Abbildung 23:** Validierung des Gentamicin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Der Nachweis von Gentamicinrückständen auf halbem MRL-Niveau ist sicher möglich.

Die Werte für dotierte Proben lagen im Bereich von 36,2 – 43,9 %, also deutlich unterhalb von T (74,8 %). Der Gentamicin-Nachweis im Biosensor kann somit Rückstände sicher bei der halben zulässigen Rückstandsmenge (MRL = 50 µg/kg) detektieren (Abbildung 23).



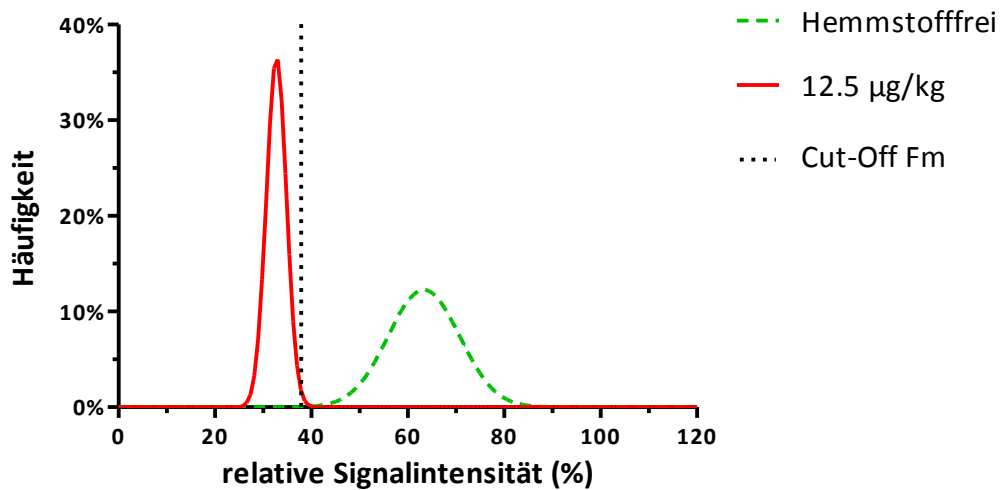
Therapeutisch eingesetztes **Neomycin**, das ebenfalls zur Gruppe der Aminoglycoside gehört, besteht hauptsächlich aus den Stereoisomeren Neomycin C und Neomycin B. Der MRL für Neomycin in Fleisch beträgt 500 µg/kg.



**Abbildung 24:** Validierung des Neomycin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Fleischsaft, der mit der halbmaximal zugelassenen Rückstandshöchstmeng für Neomycin dotiert wurde, führt zu einer nahezu vollständigen Hemmung des entsprechenden Messsignals.

Die Zielkonzentration  $\frac{1}{2}$  MRL führte – wie aufgrund der hohen Sensitivität ( $IC_{50} = 1,5 \mu\text{g/l}$ ) zu erwarten war – zu einer sehr deutlichen Unterscheidung der relativen Signalintensitäten von dotiertem und undotiertem Fleischsaft, mit dem Test ist somit eine sichere Identifikation von rückstandsbelasteten Proben (Abbildung 24) möglich. Wie auch bei anderen Einzeltests, deren Empfindlichkeit deutlich unterhalb des entsprechenden MRL lag, wurden zusätzliche Dotierungsversuche durchgeführt um die geringste Konzentration, bei der Rückstände sicher detektiert werden können, zu ermitteln.

## Neomycin

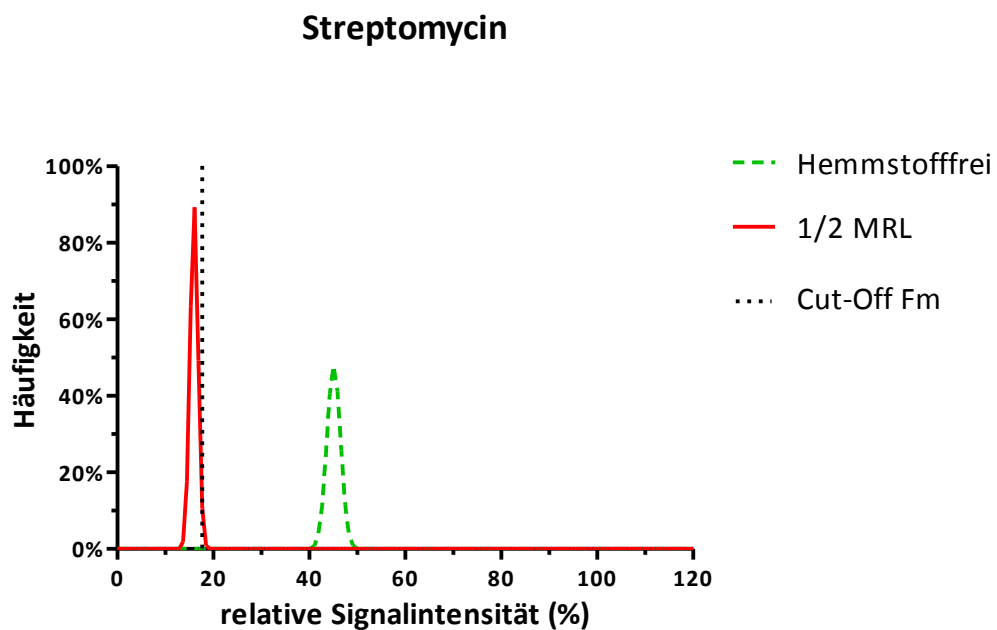


**Abbildung 25:** Normalverteilungskurven für die Messergebnisse (relativ zu Referenzpuffer) von mit Neomycin dotiertem und undotiertem Fleischsaft. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Nachweises, konnte das Screening für ein Vierzigstel der zugelassenen Höchstmenge validiert werden.

Für die zweite, verringerte Zielkonzentration lagen die Normalverteilungskurven deutlich näher beieinander (Abbildung 25). Ein Messwert der 20 dotierten Proben lag mit 38,3 % zwar oberhalb von Fm (37,9 %), das Screeningverfahren erfüllt für Neomycinrückstände bis 12,5 µg/kg aber trotzdem die gesetzlichen Vorgaben, die eine 95 %ige Sicherheit beim Nachweis von Rückständen auf Zielkonzentrations-Niveau vorschreiben. Das Nachweisvermögen dieses Tests liegt also bei einem Vierzigstel der zugelassenen Höchstmenge.

Neben den Aminoglycosid-Antibiotika Gentamicin und Neomycin können auch **Streptomycin-Rückstände** mittels Biosensor detektiert werden. Aufgrund seiner Toxizität (geringe therapeutische Breite) und der schnellen Resistenzentwicklung findet es (als Kombinationspräparat mit Penicillin G) hauptsächlich für die intramammäre Therapie bei milchliefernden Nutztieren Verwendung.

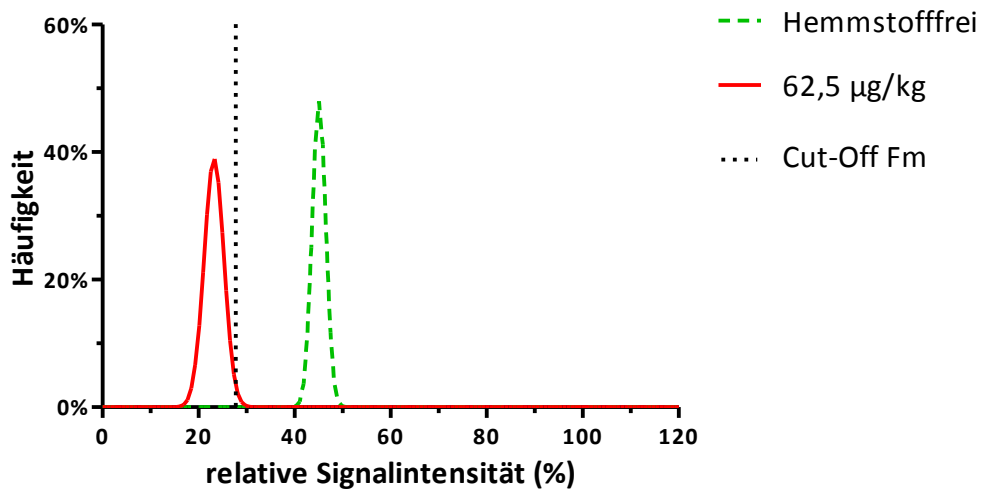
In den Vorversuchen für die Validierungsstudie (D.2.1) wurde deutlich, dass beim Streptomycin-Nachweis vergleichsweise starke Matrixeffekte bei der Untersuchung von Fleischsaft auftreten. Dementsprechend liegt das Signal für hemmstofffreien Fleischsaft relativ niedrig (46,7 %).



**Abbildung 26:** Validierung des Streptomycin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Bedingt durch die bei diesem Test ausgeprägten Matrixeffekte liegt das relative Signal für hemmstofffreien Fleischsaft im Mittel bei nur 46,7 %.

Da die Biosensor-Analyse als qualitatives Verfahren validiert wurde, bei der die Diskriminierung von positiven und negativen Proben auf relativen Signalen beruht, stellten diese Matrixeffekte für den Nachweis von Streptomycinrückständen auf halbem MRL-Niveau (MRL = 500) allerdings kein Hindernis dar (Abbildung 26).

## Streptomycin



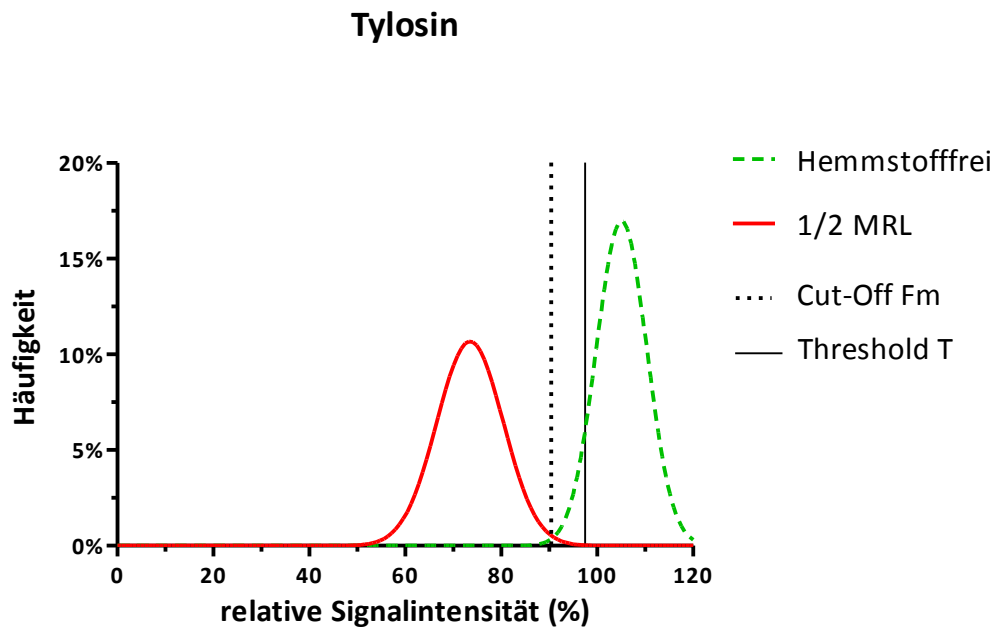
**Abbildung 27:** Normalverteilungskurven für hemmstofffreie und mit 62,5 µg/kg dotierte Fleischproben mittels Biosensor. Trotz der beim Streptomycinnachweis deutlichen Matrixeffekte konnten Rückstände bis zu einem Achtel der zugelassenen Höchstmenge sicher nachgewiesen werden.

Auch zum Nachweis von niedrigeren Rückstandskonzentrationen konnte der Test erfolgreich validiert werden: Das Nachweisvermögen lag bei 62,5 µg/kg und somit um Faktor Acht unterhalb des für Streptomycin festgelegten MRLs (Abbildung 27).

Der mAk, der zum Nachweis von Streptomycin eingesetzt wird, verfügt über eine im Biosensor getestete ausgeprägte Kreuzreaktivität zu Dihydrostreptomycin; aufgrund dieser Kreuzreaktivität kann DHS sicher bei der halben Rückstandshöchstmenge detektiert werden: der Fm-Wert für den ½ MRL liegt bei 21,2 %, die Normalverteilungskurven sind im Anhang dargestellt.

### 3.2.4 Makrolide

Als einziges Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide ist **Tylosin** auf den Microarray-Chip implementiert. Die bakteriostatische Wirkung basiert auf der Hemmung der Proteinsynthese an der 50S-Unterheit der Ribosomen. Die Matrix Fleischsaft hat nur einen geringen Effekt auf den Tylosin-Nachweis, relativ zum Referenzpuffer liegt das Signal bei über 100 %.



**Abbildung 28:** Validierung des Tylosin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Eine Hemmstoffkonzentration von 50 µg/kg kann sicher nachgewiesen werden, allerdings besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Proben.

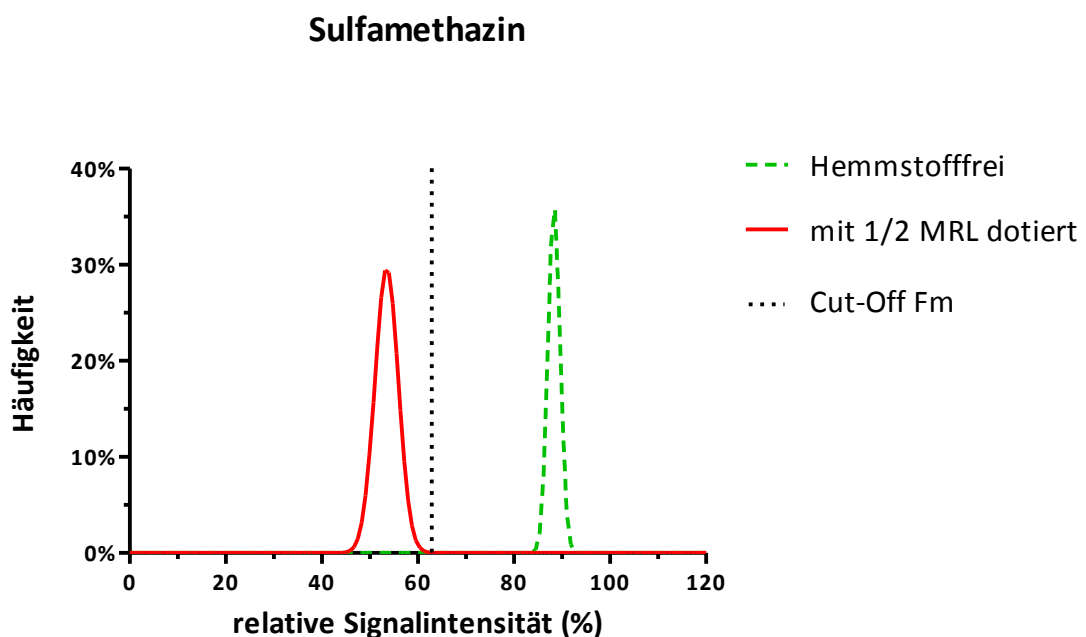
Der  $CC\beta$ -Wert für den Tylosinnachweis liegt bei der einzigen getesteten Konzentration 50 µg/kg, dem halbem MRL (Abbildung 28). Aufgrund der im Vergleich zu anderen Einzelnachweisen breiten Normalverteilungskurven, die sich geringgradig überschneiden kann es zu falsch-positiven Resultaten kommen. Eine weitere Auffälligkeit beim Tylosin-Nachweis war, dass prinzipiell die Messwerte für Fleischsaftproben höher lagen als die des als Referenz eingesetzten Puffers: Durchschnittlich lagen die Werte bei für hemmstofffreien Fleischsaft bei 104,9 %. Neben Tylosin weist der eingesetzte mAk auch Kreuzreaktivitäten mit Tylvalosin auf, die für orientierende Versuche eingesetzte Konzentration von 250 µg/kg (das 5-fache der gesetzlich festgelegten Höchstkonzentration) wurde mit  $F_m = 65,5\%$  sehr

sicher erkannt. Die Normalverteilungskurven, die nahe legen, dass auch niedrigere Konzentrationen sicher detektiert werden können, sind im Anhang zu finden.

### 3.2.5 Sulfonamide

Sulfonamide gehören neben Penicillinen und Tetrazyklinen zu den am häufigsten eingesetzten antimikrobiellen Substanzen; sie hemmen die Folsäuresynthese von wachsenden Mikroorganismen. **Sulfamethazin** (=Sulfadimidin) eignet sich aufgrund seiner raschen Absorption im Gastrointestinaltrakt gut für die orale Applikation und wird nahezu ausschließlich in der Tiermedizin eingesetzt.

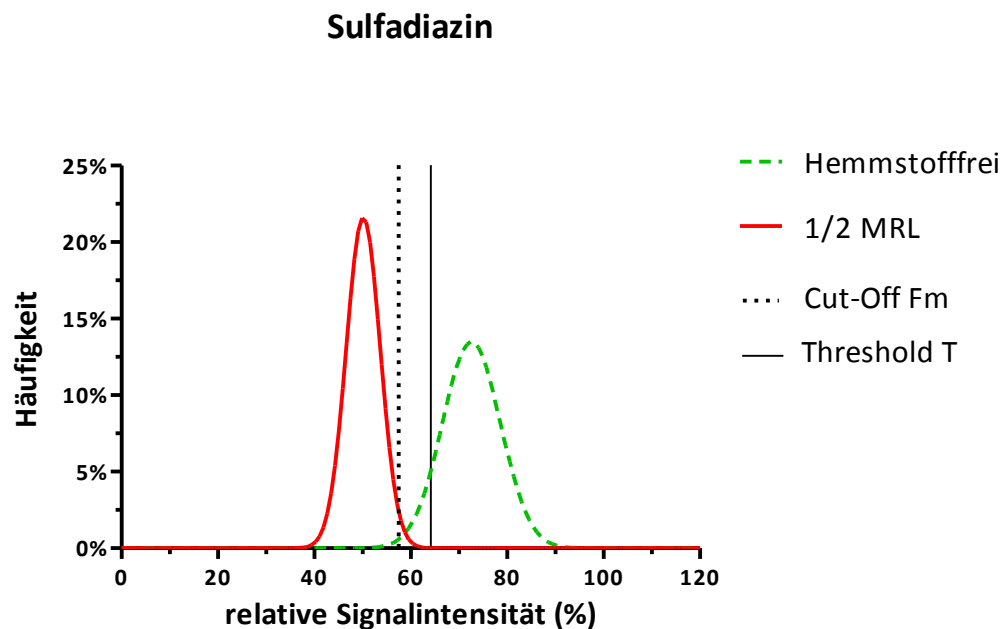
Die relativen Signalwerte für Fleischsaft, der mit halbem MRL (MRL = 100 µg/kg) dotiert wurde, unterscheiden sich eindeutig von denen für unbelastete Proben (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Validierung des Sulfamethazin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor. Die Auftrennung hemmstofffreier und mit halbem MRL dotierter Proben ist eindeutig.

Für den Nachweis von Sulfamethazin sind die beiden Normalverteilungskurven deutlich getrennt, der Wert für Fm (62,9 %) liegt in sicherem Abstand zum Mittelwert der undotierten Proben B (88,2 %).

Der Nachweis für **Sulfadiazin**, das zweite untersuchte Sulfonamid, unterschied sich in den Vorversuchen durch die etwas geringere Sensitivität vom Sulfamethazintest (Testmittelpunkte in Caseinpuffer: 15,3 µg/kg bzw. 11,7 µg/kg); die festgelegte Rückstandshöchstmenge ist jedoch für beide Substanzen gleich (MRL = 100 µg/kg).



**Abbildung 30:** Normalverteilungskurven für die Messergebnisse (relativ zu Referenzpuffer) von mit Sulfadiazin dotiertem und undotiertem Fleischsaft. Da sich die Kurven minimal überschneiden besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Resultaten.

Die geringere Empfindlichkeit zeigte sich auch bei der Untersuchung dotierter Proben: Hemmstoffhaltige Proben mit Rückstandskonzentrationen auf ½ MRL-Niveau können sicher detektiert werden, allerdings besteht – vergleichbar mit den Nachweisen von Penicillin G und Tylosin – eine geringe statistische Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen (Abbildung 30). Der für den Sulfadiazin-Nachweis eingesetzte mAk verfügt über

Kreuzreaktionen mit Sulfamerazin (CR = 24 %) und Sulfathiazol (CR = 13 %). Die für diese beiden Sulfonamide in orientierenden Versuchen getestete Konzentration von 500 µg/kg entspricht jeweils dem 5-fachen der rechtlich vorgeschriebenen Rückstandshöchstmenge; Für beide Substanzen wurde diese Konzentration erkannt, wobei jedoch für den Nachweis von Sulfathiazol Fm mit 65,6 % leicht oberhalb des T-Wertes für den Sulfadiazin-Spot (64,2 %) liegt und somit für diesen Test mit einer Anzahl von > 5 % falsch-positiver Resultate zu rechnen ist. Für den Fm-Wert von Sulfamerazin ist dies nicht der Fall, jedoch liegen auch hier die Normalverteilungskurven (für beide durch Kreuzreaktionen erkannten Hemmstoffe im Anhang dargestellt) nahe beieinander.

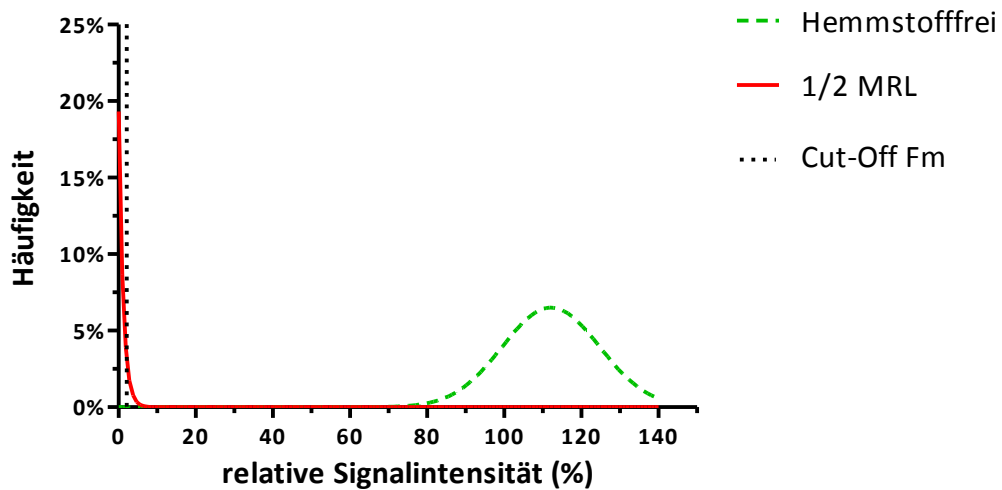
### **3.2.6 Chinolone**

Chinolone erhalten ihre bakterizide Wirkung durch die Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase (die analog zur eukaryotischen Topoisomerase wirkt). Chinolone werden im Vergleich zu anderen Hemmstoffen in geringerer Dosierung eingesetzt.

Der generische Antikörper für Chinolon-Antibiotika zeigte in Vorversuchen zur Detektion von Enrofloxacin (in 1 % Casein/PBS) einen Testmittelpunkt von 0,5 µg/l, deutlich unterhalb der Rückstandshöchstmenge (der MRL von 100 µg/kg bezieht sich auf die Summe von Enrofloxacin und Ciprofloxacin). Mit 50 µg/kg dotierter Fleischsaft führte daher bei der Untersuchung im Biosensor zu einer nahezu vollständigen Hemmung des Signals (Abbildung 31).



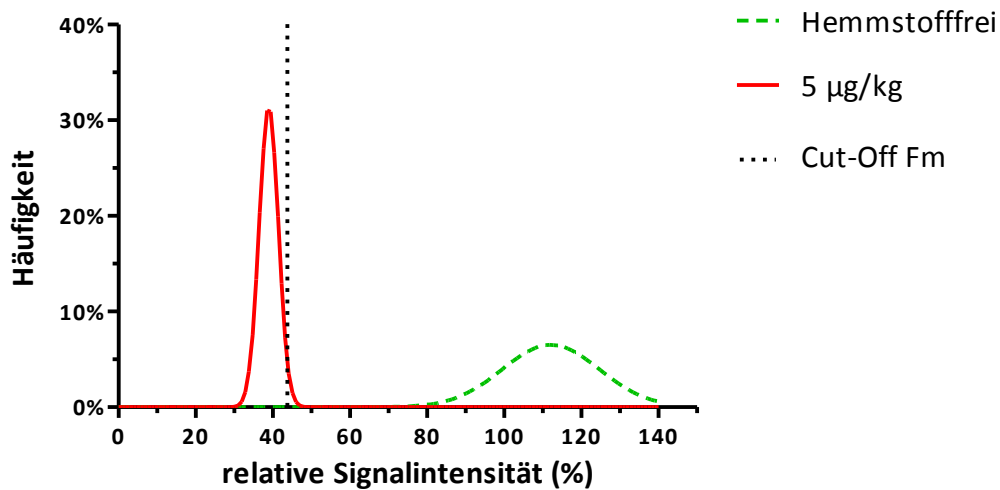
## Enrofloxacin



**Abbildung 31:** Normalverteilungskurven für die Messergebnisse (relativ zu Referenzpuffer) von mit Enrofloxacin dotiertem und undotiertem Fleischsaft. Aufgrund der hohen Testsensitivität wird das Signal des Enrofloxacin-Spots nahezu vollständig gehemmt.

Wie bei den anderen sehr empfindlichen Einzelnachweisen wurde auch hier ein weiterer Versuch mit verringerter Dotierungskonzentration durchgeführt. Entsprechende Analysen zeigten, dass auch bei einer Konzentration von 5 µg/kg (ein Zwanzigstel des MRL) hemmstoffhaltige und hemmstofffreie Proben eindeutig diskriminiert werden können (Abbildung 32).

## Enrofloxacin



**Abbildung 32:** Normalverteilungskurven für die Messergebnisse (relativ zu Referenzpuffer) von mit Enrofloxacin dotiertem und undotiertem Fleischsaft. Auch bei einem Zwanzigstel der Rückstandshöchstmenge sind positive Proben sicher von hemmstofffreien zu unterscheiden.

Neben der hohen Sensitivität des Enrofloxacinnachweises weist der Antikörper auch Kreuzreaktionen zu allen anderen mit Rückstandshöchstmengen belegten Chinolonen auf (Abschnitt D.1.3, Kreuzreaktionen). Um diese Kreuzreaktivitäten in der Matrix Fleischsaft zu testen wurde in orientierenden Versuchen Fleischsaft von Rind und Schwein mit jeweils der halb-maximalen rechtlich festgelegten Rückstandskonzentration von Oxolinsäure (das für die Behandlung von Rindern und Schweinen zugelassene Chinolonantibiotikum, für das die geringste Kreuzreaktion ermittelt wurde) und Sarafloxacin (für das für Hähnchenfleisch ein MRL von 10 µg/kg festgelegt ist) dotiert. Die aus jeweils 16 Messungen resultierenden Fm-Werte liegen mit 9,2 % für 50 µg/kg Oxolinsäure und 80,2 % für 5 µg/kg Sarafloxacin unterhalb des T-Wertes (86,0 %) für den Enrofloxacin-Spot, die beiden Chinolone können – den orientierenden Versuchen zufolge – also in den getesteten Konzentrationen detektiert werden. Für beide Antibiotika sind die Normalverteilungskurven im Anhang dargestellt.

### ***3.2.7 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse***

Bis auf den Cephapirin-Nachweis, bei dem Rückstände nur auf einfachem MRL-Niveau detektiert werden können, werden alle untersuchten Hemmstoffe auf Niveau der halben rechtlich vorgeschriebenen Rückstandshöchstmengen korrekt als positiv eingestuft und identifiziert. Für Antibiotika, die auch bei deutlich geringeren Konzentrationen sicher erkannt werden (Cloxacillin, Nafcillin, Neomycin, Streptomycin, Enrofloxacin), wurde zusätzlich ein zweiter Cut-Off-Wert etabliert, der eine Aussage über Hemmstoffrückstände weit unterhalb der zugelassenen Konzentrationen zulässt. In Tabelle 10 zusammengefasst sind die Cut-Off-Werte (angegeben als relative Signalintensitäten im Vergleich zum Referenzpuffer) für den jeweils halben MRL, sowie die Werte für das Nachweisvermögen  $CC\beta$  der einzelnen Nachweise. Für Antibiotika, für die keine geringere Konzentration untersucht wurde (Penicillin G, Ceftiofur, Gentamicin, Tylosin, Sulfamethazin und Sulfadiazin), entspricht  $CC\beta$  dem halben MRL.

**Tabelle 10:** Entscheidungsgrenzen für das Hemmstoffscreening in Fleischsaft: Mittelwert der relativen Signalintensitäten für hemmstofffreien (B) sowie für dotierten Saft (M), die Entscheidungsgrenzen für hemmstofffreien Saft (T) und für Antibiotikarückstände (Fm). Die Cut-Off Werte für Rückstände wurden jeweils bei halbem MRL (1/2 MRL) und bei hochsensitiven Nachweisen zusätzlich für die kleinste sicher nachweisbare Rückstandskonzentration (CC $\beta$ ) ermittelt (für Nachweise, für die keine geringere Konzentration getestet wurde, entspricht  $\frac{1}{2}$  MRL dem Nachweisvermögen CC $\beta$ ). Für jeden der Werte wurden mindesten n = 20 Messungen mit Fleischsaft von verschiedenen Tieren (Rind und Schwein) ausgewertet.

Nachweis	Undotierte Proben		Zielkonzentration: 1/2 MRL			Zielkonzentration: CC $\beta$		
	B	T	Dotiert mit	M	Fm	Dotiert mit	M	Fm
Penicillin G <sup>1</sup>	66,6%	52,7%	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	33,5%	40,3%	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	33,5%	40,3%
Cloxacillin	94,9%	87,6%	150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3,3%	3,7%	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	35,2%	39,5%
Nafcillin	78,3%	66,4%	150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,9%	1,0%	15 $\mu\text{g}/\text{kg}$	41,4%	47,7%
Cephapirin <sup>2</sup>	73,2%	51,6%	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	58,6%	77,1%	<b>50 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	31,5%	36,5%
Ceftiofur <sup>3</sup>	65,8%	61,3%	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	24,6%	28,4%	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	24,6%	28,4%
Gentamicin <sup>1</sup>	87,0%	74,8%	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	40,5%	44,4%	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	40,5%	44,4%
Neomycin B	63,7%	53,5%	250 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1,8%	2,4%	12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	33,7%	37,9%
Streptomycin	46,7%	42,0%	250 $\mu\text{g}/\text{kg}$	16,9%	17,7%	62,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	25,0%	27,8%
Tylosin <sup>1</sup>	104,9%	97,5%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	75,9%	90,4%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	75,9%	90,4%
Sulfamethazin <sup>1</sup>	88,2%	80,1%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	54,4%	62,9%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	54,4%	62,9%
Sulfadiazin <sup>1</sup>	73,5%	64,2%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50,8%	57,5%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50,8%	57,5%
Enrofloxacin	115,1%	86,0%	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,6%	2,1%	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	34,6%	43,8%

<sup>1</sup> Für Einzelnachweise, bei denen die dem  $\frac{1}{2}$  MRL entsprechenden Analytkonzentrationen auch das Nachweisvermögen darstellt, wurden keine weiteren Versuche mit geringerer Zielkonzentration durchgeführt

<sup>2</sup> Zielkonzentration im zweiten Versuch auf MRL erhöht (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; n = 40)

<sup>3</sup> Für detailliertere Untersuchungen zur Bestimmung von CC $\beta$  standen entsprechende Chips nicht mehr zur Verfügung

Zusätzlich zu den auf den Chip gespotteten Hemmstoffen können durch die in D.1.3 beschriebenen Kreuzreaktionen weitere Antibiotika nachgewiesen werden, in orientierenden Versuchen wurde dazu Fleischsaft (eine Mischung aus Saft von Rind und Schwein) mit Standardlösungen dotiert, 1:5 in PBS verdünnt und in 16 Wiederholungen im Biosensor gemessen. Die Cut-Off-Werte für einige der zusätzlich detektierbaren Hemmstoffe, sind in Tabelle 11 zusammenfasst (die entsprechenden Normalverteilungskurven finden sich im Anhang), die Werte für undotierten Fleischsaft B und T (für den Nachweis von Cloxacillin, Streptomycin, Tylosin, Sulfadiazin sowie Enrofloxacin) wurden dabei aus Tabelle 10 übernommen.

**Tabelle 11:** Über Kreuzreaktionen zusätzlich detektierbare Antibiotika. Die orientierenden Versuche (n=16 Messungen in Fleischsaft) zeigen, dass auch diese Hemmstoffe zuverlässig in dieser Matrix detektiert werden können.

Hemmstoff	MRL	dotierter Fleischsaft			undotierter Fleischsaft	
	Muskulatur	dotiert mit	M	Fm	B	T
Dicloxacillin	300 µg/kg	150 µg/kg	4,7%	5,1%	94,9%	87,6%
Oxacillin	300 µg/kg	150 µg/kg	31,2%	34,1%		
DHS	500 µg/kg	250 µg/kg	19,5%	21,2%	46,7%	42,0%
Tylvalosin	50 µg/kg	250 µg/kg	60,6%	65,5%	104,9%	97,5%
Sulfamerazin <sup>1</sup>	100 µg/kg	500 µg/kg	54,8%	60,8%	73,5%	64,2%
Sulfathiazol <sup>1</sup>	100 µg/kg	500 µg/kg	57,9%	65,6%		
Oxolinsäure	100 µg/kg	50 µg/kg	7,4%	9,2%	115,1%	86,0%
Sarafloxacin <sup>2</sup>	10 µg/kg	5 µg/kg	74,1%	80,2%		

<sup>1</sup> Über Kreuzreaktivität des Sulfadiazin-Nachweises detektiert

<sup>2</sup> MRL 10 µg/kg in Hähnchenfleisch

Die Ergebnisse der Dotierungsversuche mit Hemmstoffen, die über Kreuzreaktionen detektiert werden können, zeigen, dass Dicloxacillin und Oxacillin über den Cloxacillin-Nachweis, Dihydrostreptomycin über den Streptomycin-Nachweis sowie Oxolinsäure und Sarafloxacin über den Enrofloxacin-Nachweis bei jeweils halbem MRL detektiert werden können. Insbesondere der Nachweis von Sarafloxacin bei einer Dotierungskonzentration von 5 µg/kg (der MRL ist nur für Fleisch von Hähnchen festgelegt, der orientierende Versuch

wurde in Fleischsaft von Rind und Schwein durchgeführt) zeigt erneut die Sensitivität und ausgezeichnete Kreuzreaktivität des mAk für Chinolone. Tylvalosin über den Tylosin-Nachweis sowie Sulfamerazin und Sulfathiazol über den Sulfadiazin-Nachweis können jeweils nur bei 5-facher MRL-Überschreitung detektiert werden, wobei insbesondere beim Nachweis von Sulfathiazol mit falsch-positiven Resultaten gerechnet werden muss, da hier  $F_m$  zwar unterhalb des B-Wertes liegt, jedoch knapp oberhalb des T-Wertes.

### ***3.3 Praktische Anwendbarkeit***

Die vollständige Validierung einer neuen Screeningmethode erfordert auch die Untersuchung der Robustheit des Testsystems. Da die Bedingungen für die eigentliche Messung im Biosensor konstant sind (alle Volumina, Durchflussgeschwindigkeiten und Temperaturen sind softwaregesteuert und werden kontinuierlich überwacht) wurde für diesen Validierungsparameter das Hauptaugenmerk auf eine mögliche Verschleppung zwischen einzelnen Messungen sowie die Haltbarkeit der Microarray-Chips gelegt.

#### ***3.3.1 Verschleppung***

Da in den beiden Messkanälen eines Chips jeweils bis zu 50 aufeinanderfolgende Proben gemessen werden, wurde getestet, ob nach Analyse von hochkontaminierten Proben eine Verschleppung auftritt, die zu falsch-positiven Resultaten bei darauffolgenden hemmstofffreien Proben führen könnte. Zu diesem Zweck wurden die relativen Signale für hemmstofffreien Fleischsaft direkt nach Messungen von a) undotiertem Fleischsaft, b) mit dem MRL jedes Antibiotikums dotierten, c) mit dem dreifachen MRL jedes Antibiotikums dotierten Proben ermittelt (Tabelle 12). Diese Messungen wurden für beide Konzentration fünfmal durchgeführt, die Werte für a) wurden bei der Etablierung der Cut-Off-Werte gewonnen ( $n = 20$ ). Die erhaltenen relativen Signalintensitäten wurden anschließend mit den für das Screening ermittelten Cut-Off-Werten verglichen, um mögliche falsch-positive Resultate zu identifizieren.

**Tabelle 12:** Relative Messsignale für hemmstofffreien Fleischsaft, ermittelt direkt nach Analyse von: a) undotiertem Fleischsaft b) mit 1×MRL dotiertem Fleischsaft c) mit 3×MRL dotiertem Fleischsaft. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 5 Einzelmessungen.

Nachweis	Relative Messsignale		
	a	b	b
Penicillin G	66.6%	63.2%	66.2%
Cloxacillin	94.9%	95.9%	95.6%
Nafcillin	78.3%	75.6%	80.4%
Cephapirin	73.2%	63.5%	72.2%
Ceftiofur	65.8%	61.9%	61.7%
Gentamicin	87.0%	91.4%	91.6%
Neomycin B	63.7%	70.1%	<b>47.0%</b>
Streptomycin	46.7%	52.2%	54.0%
Tylosin	104.9%	105.7%	109.7%
Sulfamethazin	88.2%	82.5%	82.3%
Sulfadiazin	73.5%	70.0%	72.4%
Enrofloxacin	115.1%	113.2%	116.3%

Die Untersuchungen zeigten, dass lediglich im Neomycin-Nachweis nach Analyse eines mit dem dreifachen MRL dotierten Fleischsaftes eine Verschleppung auftrat. Das Signal war hier im Mittel der fünf Messungen (47,0 %) deutlich niedriger als nach Analyse von hemmstofffreiem (63,7 %) Fleischsaft. Trotz des Verschleppungseffektes wurden die auf kontaminierte Proben folgenden hemmstofffreien Proben in allen Fällen und mit beiden Cut-Off-Werten ( $F_m = 2,4\%$  für den halben MRL und  $F_m = 37,9\%$  für CC $\beta$ ) weiterhin korrekt als negativ identifiziert.

### 3.3.2 Haltbarkeit der Mikroarray-Chips

Die Haltbarkeit der Antibiotika-Chips (die bei 4 °C gelagert werden) wird vom Ceftiofur-Nachweis begrenzt: Bei Analysen, die innerhalb der ersten 3 Monate nach Herstellung durchgeführt wurden, lag das Startsignal bei 3000-5000 a.u.; nach einem halben Jahr wurde in den ersten Messungen noch ein Signal von über 2000 a.u. erreicht. Nach Lagerung über 12 Monate und mehr lag das Anfangssignal im Durchschnitt bei 1500 a.u., bei einigen Chips allerdings auch bei knapp unter 1000 a.u.

---

Zusammen mit dem Signalabfall, der nach 50 Messzyklen zu einer Reduktion des Lichtsignals auf 38,3 % des Startsignals führt, näherte sich somit das absolute Signal für hemmstofffreien Laufpuffer dem Signal der Negativkontrolle (100 – 200 a.u.) an. Nach einem Jahr Lagerung konnten daher für den Nachweis von Ceftiofur keine zuverlässigen Messungen mehr durchgeführt werden.



### ***3.4 Untersuchung von Realproben***

Um die Anwendbarkeit des – mit dotiertem Fleischsaft validierten – Screeningverfahrens für „natürlich gewachsene“ Proben zu testen, wurde hemmstoffhaltige Muskulatur (n = 28) von Rind und Schwein mit dem etablierten Biosensor-Testsystem untersucht. Die bei Routineuntersuchungen im 3-Platten Test verdächtig reagierenden Proben waren am LGL Erlangen unter der Leitung von Dr. Götz-Schmidt mit der dort etablierten Bestätigungsmethode (LC-MS/MS) analysiert, sowie die entsprechenden Wirkstoffe identifiziert und quantifiziert worden. Die Proben waren teilweise vor Erhalt bis zu zwei Jahre bei -20 °C gelagert worden. Die Biosensor-Analyse erfolgte wie beschrieben, nach Gewinnung des Fleischsaftes durch die Auftau-Methode wurde die Probe 1:5 in PBS verdünnt und im Biosensor gemessen. Die erhaltenen relativen Signalintensitäten wurden mit den in Abschnitt 3.3 beschriebenen Cut-Off-Werten verglichen, um positive Proben zu identifizieren.

Die untersuchten Muskulaturstücke von Rind und Schwein enthielten verschiedene Hemmstoffe, sowohl oberhalb (Tabelle 13) als auch unterhalb (Tabelle 14) der halben zulässigen Höchstmengen. Bei 5 Proben konnten mittels LC-MS/MS keine Antibiotikarückstände gefunden werden und sie wurden daher als bestätigt-negative Kontrollproben bei der Biosensor-Untersuchung eingesetzt.

Prinzipiell wurden alle 26 letztendlich in die Auswertung einbezogenen Proben, die Rückstandsmengen von  $> \frac{1}{2}$  MRL enthielten, korrekt als positiv eingestuft, zudem wurden mit beiden Verfahren (Biosensor bzw. LC-MS/MS) die gleichen Antibiotikagruppen in den Proben nachgewiesen (Tabelle 13, Proben A–H). Bei Probe E, die drei verschiedene Antibiotikarückstände in Konzentrationen von  $> \frac{1}{2}$  MRL enthielt, wurden alle drei Rückstände erkannt. Eine Probe, deren Rückstandsgehalt nur knapp über der Zielkonzentration der Screeningmethode lag (Probe H, gemessener Gentamicinrückstand 30 µg/kg; die Zielkonzentration liegt bei 25 µg/kg), wurde auch korrekt als positiv eingestuft, wobei der Messwert knapp unterhalb der Entscheidungsgrenze lag (relatives Signal = 42,3 %; Cut-Off-Wert für Gentamicin = 44,4 %). Diese Ergebnisse bestätigen somit auch indirekt die Eignung von Fleischsaft als aussagekräftiges Probenmaterial, da auch ohne eine Extraktion im engeren Sinne die im Fleisch vorhandenen Antibiotikagruppen zuverlässig nachgewiesen werden konnten.

Die Analyse der Realproben bestätigte zudem die in Vorversuchen bestimmten Kreuzreaktionen der Einzelnachweise: Dies gilt zum einen für den generischen Nachweis der Chinolone, da Ciprofloxacin- und Marbofloxacin-kontaminierte Proben in der Biosensoranalyse als positiv eingestuft wurden (Proben A, B, E, J und M). Zum anderen reagierte auch eine Dihydrostreptomycin-haltige Probe im Streptomycin-Nachweis positiv (Probe I). Bei der Untersuchung der Realproben reagierten zudem auch Proben, die Rückstände von Amoxicillin enthielten, im Penicillin-G Nachweis eindeutig positiv (Proben E und G), was darauf hinweist, dass dieser Antikörper möglicherweise auch Metaboliten bzw. Abbauprodukte dieses Penicillins erkennt.

Zwei Proben wurden von der Untersuchung der Realproben ausgeschlossen, da sie keine eindeutigen Ergebnisse ergaben: Eine Probe mit sehr hohen Rückstandskonzentrationen (Muskulatur vom Kalb, die LC-MS/MS-Untersuchung ergab 1000 µg/kg Penicillin G, 241 µg/kg Dihydrostreptomycin und 83 µg/kg Gentamicin) wurde im Biosensorscreening als eindeutig negativ bestimmt. Nach einer erneuten LC-MS/MS-Analyse dieser Probe, die die ersten Ergebnisse bestätigte, wurde die Rückstellprobe im Biosensor untersucht. Diesmal wurden alle Rückstände korrekt identifiziert. Eine andere Realprobe (Muskulatur vom Schwein) – bei der LC-MS/MS-Analyse wurden keine Rückstände gefunden – wurde im Screening als positiv für Penicillin, Gentamicin und Tylosin (relative Signalintensitäten: 25,5 %, 35,2 % und 84,0 %) eingestuft. Auch diese Probe wurde mit der Bestätigungsmethode nachuntersucht, erneut wurden keine Hemmstoffe detektiert. Für diese Probe gab es keine Rückstellprobe, so dass der Test im Biosensor nicht wiederholt werden konnte.

**Tabelle 13:** Untersuchung von natürlich gewachsenen Proben mit Rückständen oberhalb der halben Rückstandshöchstmenge mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode. Die relativen Signalstärken der Biosensormessungen (Sr) wurden mit den Fm für den jeweils halben MRL und (soweit zusätzlich ermittelt) für das CC $\beta$  verglichen. Alle Hemmstoffe, die einen der Cut-Off-Werte für eine Substanz unterschritten sind in den Spalten „Biosensor-Screening“ aufgeführt. Hervorgehoben sind die Fm-Werte, die von der jeweiligen Probe unterschritten wurden.

Probe	Tierart	LC-MS/MS		Biosensor-Screening		Validierungsdaten		Bewertung
		Rückstand	Konzentration	Hemmstoff	Sr	Fm(1/2 MRL)	Fm(CC $\beta$ )	
<b>Rückstände &gt; 1/2 MRL</b>								
A	Rind	Enrofloxacin <sup>1</sup>	2922 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Enrofloxacin	1,1%	<b>2,1%</b>	<b>43,8%</b>	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		Ciprofloxacin <sup>1</sup>	945 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	-	-	-	-
B	Rind	Marbofloxacin <sup>2</sup>	1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Enrofloxacin	0,9%	<b>2,1%</b>	<b>43,8%</b>	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
				Tylosin	86,9%	<b>90,4%</b>	-	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
				Penicillin G	30,4%	<b>40,3%</b>	-	> 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$
C	Rind	Penicillin G	280 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Penicillin G	16,7%	<b>40,3%</b>	-	> 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$
D	Rind	Gentamicin	234 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Gentamicin	3,5%	<b>44,4%</b>	-	> 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$
E	Schwein	Sulfamethazin	197 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Sulfamethazin	61,5%	<b>62,9%</b>	-	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		Marbofloxacin <sup>2</sup>	169 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Enrofloxacin	1,3%	<b>2,1%</b>	<b>43,8%</b>	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		Amoxicillin <sup>3</sup>	78 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Penicillin G	32,9%	<b>40,3%</b>	-	> 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$
F	Rind	Sulfamethazin	160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Sulfamethazin	62,3%	<b>62,9%</b>	-	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
G	Schwein	Amoxicillin <sup>3</sup>	105 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Penicillin G	3,5%	<b>40,3%</b>	-	> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
				Nafcillin	44,2%	1,0%	<b>47,7%</b>	> 15 – < 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$
H	Rind	Gentamicin	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Gentamicin	42,3%	<b>44,4%</b>	-	> 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$
				Penicillin	29,6%	<b>40,3%</b>	-	> 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$

<sup>1</sup> Der MRL (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) gilt für die Summe von Enrofloxacin und Ciprofloxacin.

<sup>2</sup> Wird über eine Kreuzreaktion des mAk für Enrofloxacin detektiert.

<sup>3</sup> Vermutet wird, dass ein Metabolit oder Abbauprodukt von Amoxicillin mit den eingesetzten mAk gegen Penicillin G reagiert.

**Tabelle 14:** Untersuchung von natürlich gewachsenen Proben mit Rückständen unterhalb der halben Rückstandshöchstmenge

Probe	Tierart	LC-MS/MS		Biosensor-Screening		Validierungsdaten		Bewertung
		Rückstand	Konzentration	Hemmstoff	Sr	Fm(1/2 MRL)	Fm(CCβ)	
<b>Rückstände &lt; 1/2 MRL</b>								
I	Rind	DHS <sup>1</sup>	29 µg/kg	Streptomycin	25,4 %	17,7%	<b>27,8%</b>	> 62,5 – < 250 µg/kg
		Penicillin G	3 µg/kg	-	50,5 %	40,3%	-	Negativ
J	Rind	Enrofloxacin	14 µg/kg	Enrofloxacin	26,3 %	2,1%	<b>43,8%</b>	> 5 – < 50 µg/kg
		Ciprofloxacin	7 µg/kg	-				
K	Rind	Sulfamethazin	17 µg/kg	-	80,9%	62,9%	-	Negativ
		Penicillin G	4 µg/kg	Penicillin G	32,2 %	<b>40,3%</b>	-	> 25 µg/kg
L	Rind	Amoxicillin <sup>1</sup>	17 µg/kg	-	62,3 %	40,3%		Negativ
M	Rind	Enrofloxacin	9 µg/kg	Enrofloxacin	40,4 %	2,1%	<b>43,8%</b>	> 5 – < 50 µg/kg
		Ciprofloxacin	7 µg/kg	-				
N	Rind	Amoxicillin <sup>1</sup>	11 µg/kg	-	63,6%	40,3%	-	Negativ
O	Rind	Penicillin G	9 µg/kg	-	62,3%	40,3%	-	Negativ
P	Rind	Gentamicin	5 µg/kg		71,3%	44,4%	-	Negativ
				Penicillin G	17,7%	<b>40,3%</b>	-	> 25 µg/kg
Q	Rind	Penicillin G	3 µg/kg	-	48,3%	40,3%	-	Negativ
R	Rind	Sulfadoxin	2 µg/kg	-	-	-	-	Negativ
S	Rind	Penicillin G	2 µg/kg	-	64,6%	40,3%	-	Negativ
T	Rind	Penicillin G	1 µg/kg	-	65,8%	40,3%	-	Negativ
U	Rind	Penicillin G	1 µg/kg	-	62,8%	40,3%	-	Negativ
<b>Keine Rückstände (n = 5)</b>								
V	Rind	-	-	Tylosin	88,2 %	<b>90,4%</b>		> 50 µg/kg
W	Rind	-	-	Tylosin	84,7 %	<b>90,4%</b>		> 50 µg/kg

<sup>1</sup> Dihydrostreptomycin wird über eine Kreuzreaktion des mAk für Streptomycin nachgewiesen.

<sup>2</sup> Für Amoxicillinrückstände wurden die relativen Signalintensitäten des Penicillin-G-Nachweises aufgeführt.

Gewachsene Proben mit Antibiotikagehalten deutlich unterhalb der halben jeweiligen Rückstandshöchstgrenzen (Tabelle 14, Proben I-U) wurden bei Anwendung der entsprechenden Cut-Off-Werte in den allermeisten Fällen korrekt als negativ eingestuft (mit Ausnahme der Probe K, die mit einem Rückstand von 4 µg/kg als positiv für Penicillinrückstand bewertet wurde). Bei Anwendung des empfindlicheren CCβ wurden für einige Hemmstoff-Nachweise auch bei geringen Rückstandskonzentrationen positive Ergebnisse erhalten (Dihydrostreptomycin und Chinolone in den Proben I, J und M, mit relativen Signalintensitäten zwischen ½ MRL und CCβ).

Die Untersuchung der fünf Proben, bei denen die LC-MS/MS-Analyse keine Rückstände detektiert hatte, ergab bei Anwendung des Cut-Off-Wertes für ½ MRL in zwei Fällen falsch-positive Resultate für Tylosin (Tabelle 14, Proben V und W). Insgesamt ergaben die 312 Einzeltests (26 Proben, die jeweils auf 12 Hemmstoffe hin untersucht wurden) sieben falsch-positive Resultate: drei für Tylosin (B, V und W) und vier für Penicillin (B, H, K und P), was einer falsch-positiv-Rate von 2,2 % entspricht. Bei Anwendung der Cut-Off-Werte für CCβ erhöht sich diese Rate auf 2,6 %, da hier ein zusätzliches falsch-positives Ergebnis anfiel (Nafcillin, Probe G). Bei den drei für Tylosin falsch-positiven Resultaten lagen die relativen Signalintensitäten (84,7 % sowie 86,9 % und 88,2 %) knapp unterhalb des F<sub>m</sub>, der für den Tylosinnachweis bei halbem MRL 90,4 % beträgt.

## ***E Diskussion***

Durch den Einsatz von Hemmstoffen zur Metaphylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten bei landwirtschaftlichen Nutztieren kommt es trotz gesetzlicher Regelungen und Selbstverpflichtungen immer wieder zu Antibiotikarückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Um die Gesundheit der Verbraucher zu schützen, wurden auf nationaler und europäischer Ebene Gesetze und Verordnungen erlassen, die die Untersuchung unter anderem von Fleisch auf Hemmstoffrückstände regeln. Bei der europaweiten Durchführung von NRKPs wurden dabei in der Vergangenheit in ca. 0,18 – 0,29 % der untersuchten Proben Rückstände detektiert (EFSA, 2015). Als Screeningverfahren werden dabei üblicherweise mikrobiologische Hemmstofftests wie der EU-3- oder EU-4-Plattentest eingesetzt. Diese Methoden zeigen allerdings teilweise Schwächen beim Nachweis von bestimmten Hemmstoffgruppen auf MRL-Niveau und sind nur sehr eingeschränkt in der Lage, Antibiotika(-klassen) zu identifizieren (Pikkemaat et al., 2011).

Screeningverfahren für Hemmstoffrückstände müssen in erster Linie in der Lage sein, ein möglichst breites Spektrum der zu untersuchenden Analyten sicher auf Höhe oder idealerweise sogar unterhalb der gesetzlichen Vorgaben zu detektieren. Um die hohe Anzahl an anfallenden Untersuchungen durchführen zu können – allein in Bayern waren es im Jahr 2014 ca. 27.000 Analysen (LGL, 2014a) – sollten die verwendeten Tests zudem schnell, günstig und einfach durchzuführen sein. In einer Kooperation des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch mit dem Institut für Wasserchemie (TU München) wurde 2009 ein Antikörper-basierter, automatisierter Microarray-Chipreader mit Chemilumineszenz-Readout (Munich Chip Reader der dritten Generation, MCR3) für den Nachweis von antimikrobiellen Substanzen in Milch entwickelt (Kloth et al., 2009). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Biosensor-Verfahren an die Matrix Fleischsaft zu adaptieren und im Rahmen einer Validierungstudie zu überprüfen, ob dieses analytische Konzept prinzipiell geeignet ist, mittelfristig die etablierten Hemmstofftests zu ersetzen. Die praktische Einsetzbarkeit wurde daher auch in Vergleichsuntersuchungen von bei Routineuntersuchungen angefallenen rückstandshaltigen Fleischproben überprüft.

## ***1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse***

Da Analysedauer und Materialkosten pro Probe kritische Punkte bei der Implementierung von neuen Screening-Verfahren in die Routineanalytik darstellen, wurde in dieser Arbeit versucht, Probengewinnung und -vorbereitung möglichst einfach, schnell und günstig zu gestalten. Mit dem Ziel, auf eine klassische Probenextraktion zu verzichten und so einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, wurde Fleischsaft als eigentliche Testmatrix gewählt. Dieses Material, das durch Einfrieren, Pressen oder Zentrifugieren aus Muskulaturstücken gewonnen werden kann, enthält nach Schneider et al. (2010) in einem Milliliter die gleiche Konzentration an Hemmstoff wie ein Gramm Muskulatur. Fleischsaft kann, wie in Abschnitt D.2 beschrieben, ohne weitere Arbeitsschritte 1:5 in PBS verdünnt für Messungen im Biosensor eingesetzt werden. Bei dieser Probenverdünnungsstufe konnte die matrixbedingte Signalreduktion – die insbesondere beim Einzelnachweis von Streptomycin auffiel – ausreichend abgemildert werden. Im Vergleich zu physikalisch-chemischen Screeningverfahren entfällt somit die Extraktion, die zum einen zeitaufwändig und arbeitsintensiv ist, zum anderen den Verbrauch von teils toxischen Chemikalien erfordert (Hurtaud-Pessel et al., 2011; Cepurnieks et al., 2015). Um Fleischsaft zu gewinnen, wurden drei Methoden getestet, die je nach Ausstattung der Untersuchungsstelle eingesetzt werden können: Die Einfriermethode erfordert nur einen minimalen Arbeits- und Materialaufwand, das Einfrieren und anschließende Auftauen der Muskelblöcke dauert jedoch ca. 24 h; wesentlich schneller (unter 1 min pro Probe), jedoch auch deutlich arbeitsintensiver ist die Pressmethode, die im Übrigen in modifizierter Form auch für die Validierung eines mikrobiologischen Screeningverfahrens eingesetzt wurde (Mata et al., 2014). Als weitere Möglichkeit zur Saftgewinnung, deren Zeit- und Arbeitsaufwand zwischen den beiden anderen Techniken liegt, wurde die Zentrifugenmethode getestet. Die hierfür erforderliche Geräteausstattung ist allerdings nicht Standard in den Untersuchungsstellen vor Ort, so dass für die Entwicklung des Screeningverfahrens durch die Einfrier- bzw. Pressmethode gewonnener Fleischsaft eingesetzt wurde. Letztendlich konnte die prinzipielle Eignung des Fleischsaftes als Probenmatrix für Antibiotika-Rückstandsuntersuchungen durch die Analyse der Realproben indirekt bestätigt werden: im Vergleich zu den LC-MS/MS-Analysen, für die klassische Extraktionsverfahren eingesetzt wurden (z.B. beim  $\beta$ -Lactam-Nachweis Extraktion mit Acetonitril und Aufreinigung mittels dispersiver SPE), konnten alle Wirkstoffe qualitativ auch im Fleischsaft detektiert werden. Auch unter semi-quantitativen Gesichtspunkten lagen

die in Fleischsaft mittels Biosensor gemessenen Werte in ähnlichen Größenbereichen, so wurde zum Beispiel in einer Rindfleischprobe mittels LC-MS/MS ein Gentamicinrückstand von 30 µg/kg festgestellt, die Analyse in Biosensor ergab mit einem Messergebnis in Nähe des Cut-Off-Wertes eine semiquantitative Konzentrationsabschätzung von > 25µg/kg.

Die strategische Entscheidung, den Biosensor nur für ein qualitatives (semiquantitatives) und nicht für ein quantitatives Screening zu nutzen, war bedingt durch den in der Evaluierungsphase festgestellten Signalabfall des Microarraychips (D.1.2) über mehrere aufeinanderfolgende Mess- und Regenerationszyklen. Um anhand von Standardkurven eine quantitative Aussage zur Hemmstoffbelastung einer nachfolgend gemessenen Probe treffen zu können, hätte die Signalintensität aber konstant bleiben müssen. Die Auswertung anhand einer in den ersten Messzyklen erstellten Standardkurve hätte sonst infolge der auftretenden Signalreduktion zu einer deutlichen Überschätzung der in einer Probe vorhandenen Antibiotikakonzentration geführt. Im umgekehrten Fall, falls die Probe vor dem Standard gemessen wird, hätte dies in einer Unterschätzung des tatsächlichen Antibiotikagehaltes und damit in falsch-negativen Ergebnissen resultiert. Mit zunehmendem Messzyklus-Abstand zwischen Standardkurve und Probenmessung nimmt dieser Fehler – abhängig vom Verlauf der Signalreduktion – zu. Um ihn zu minimieren, wären mehrere über die gesamte Messung verteilte Messungen von (7-Punkt-) Standardkurven nötig, was wiederum den Probendurchsatz des Screenings deutlich verringert und zusätzliche Kosten verursacht hätte und so im Hinblick auf eine Einsetzbarkeit des Systems für Routineuntersuchungen nicht praktikabel erschien. Der Einsatz des Biosensors zur qualitativen Analyse entspricht im Übrigen auch den gesetzlichen Rahmenbedingungen, nach denen nur physikalisch-chemische Verfahren zur (quantitativen) Bestätigungsanalyse eines Hemmstoffrückstandes eingesetzt werden dürfen (Richtlinie EG Nr.657/2002).

Als Alternative wurde in jedem elften Zyklus ein Referenzpuffer gemessen und die absoluten Signalintensitäten der 10 dazwischen liegenden Probenmessungen auf den Mittelwert dieser Referenzmessungen bezogen. Daher stellt das Analyseergebnis für eine Probe keine quantitative Angabe, sondern einen relativen Wert dar, der mit experimentell gewonnenen Cut-Off-Werten abgeglichen wird, um zu bestimmen ob eine Probe für eine definierte Rückstandskonzentration als positiv oder negativ einzustufen ist. Zu beachten ist allerdings hierbei, dass es trotz des Einsatzes der Referenzmessungen zu einem Messfehler vor allem in



den ersten Zyklen eines Messtages kommt: dieser Messfehler ist zwar in Form der Standardabweichung in die Cut-Off-Werte integriert, er kann allerdings, insbesondere für die Nachweise von Cloxacillin, Cephapirin, Ceftiofur und Gentamicin (die in den ersten Zyklen den stärksten Signalabfall zeigen), möglicherweise zu unklaren Ergebnissen führen. Zur zusätzlichen Absicherung der Screeningergebnisse sollten daher bei Verwendung frischer Biochips in den ersten Messzyklen diese Nachweise eventuell erhaltene schwach positive Ergebnisse (Werte mit relativen Signalintensitäten, die sich um den jeweiligen Cut-Off-Wert bewegen), im weiteren Analyseverlauf erneut gemessen werden, um so eine Fehlanalyse sicher auszuschließen.

Prinzipiell wird durch die Einführung der Referenzmessungen, wie in D.2.4 dargestellt, das tatsächliche Ergebnis der ersten Hälfte eines Probenblocks leicht über-, das der zweiten Hälfte leicht unterschätzt (dieser Fehler führt allerdings nicht zu falschen Endresultaten). Dieses Auswerteprinzip führt weiterhin dazu, dass die Ergebnisse eines Zehnerblocks retrospektiv betrachtet werden (da die Referenzpuffermessung nach dem Probenblock abgewartet werden muss). Falls ein schnelleres Ergebnis benötigt wird, können die Proben allerdings auch relativ zur ersten Referenzpuffermessung betrachtet werden (was für die ersten 2 Messungen eines Blocks tatsächlich ein exakteres Ergebnis bringt), um eine schnelle, orientierende Abschätzung über mögliche Hemmstoffrückstände durchzuführen.

Um die Zielkonzentrationen für das Biosensorscreening zu bestimmen, bei der über die Einteilung in hemmstoffpositive oder –negative Proben entschieden wird, wurden in Vorversuchen die Sensitivitäten der Einzelnachweise (Abschnitt D.1.1) sowie Matrixeffekte von Fleischsaft (Abschnitt D.1.4) untersucht. Unter Berücksichtigung beider Parameter wurde für den ersten Dotierungsversuch eine Zielkonzentration entsprechend dem  $\frac{1}{2}$  MRL-Wert eingesetzt, eine Vorgehensweise, die auch in der Literatur beschrieben ist (Gaugain-Juhel et al., 2009). Ein Screening auf diesem Konzentrations-Niveau bietet zudem große Vorteile für die Verbrauchersicherheit: Fleisch, das die halbmaximal zulässige Konzentration an Hemmstoffen enthält, wird aufgrund des Screeningprinzips mit 95 %iger Sicherheit als positiv erkannt (Popa et al., 2012). Liegen Kontaminationen auf MRL-Niveau (ab dem bei lebenslanger Aufnahme von einer Gesundheitsgefährdung für Verbraucher ausgegangen wird) vor, erreicht die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Detektion bei der gewählten Zielkonzentration 100 Prozent (siehe auch die Normalverteilungskurven in Abschnitt D.3.2).

Der Nachweis von Cephapirin, für das Rückstandshöchstmenge nur für Fleisch vom Rind festgelegt sind, konnte allerdings nicht auf diesem Niveau validiert werden, der Cut-Off-Wert wurde daher in einem zweiten Dotierungsversuch für die Zielkonzentration 50 µg/kg (MRL-Wert) etabliert. Grundsätzlich geht das Screening auf einem Konzentrationsniveau unterhalb der gesetzlichen vorgeschriebenen Werte allerdings mit einer erhöhten Anzahl an benötigten Bestätigungsanalysen einher (Perme et al., 2010): Rückstände oberhalb des 1/2 MRL werden korrekt als positiv identifiziert, jedoch ist nicht sicher, ob eine tatsächliche Grenzwertüberschreitung vorliegt. Die Anzahl der bestätigten Fälle mit Rückstandskonzentrationen zwischen 1/2 MRL und MRL ist jedoch äußerst gering (Maurus, pers. 2016) und beim Abwägen zwischen Verbraucherschutz und eventuell zusätzlich anfallenden Kosten hat stets die Verbrauchersicherheit Vorrang.

Zusätzlich zur Zielkonzentration 1/2 MRL wurden in einem weiteren Dotierungsversuch für Antibiotikanachweise, deren Sensitivität es zuließ, Cut-Off-Werte für noch geringere Rückstandskonzentrationen entwickelt: so kann z.B. Enrofloxacin (MRL = 100 µg/kg) noch in einer Konzentration von 5 µg/kg sicher nachgewiesen werden. Für diese Tests kann – über die EU-Vorgaben für Screeningverfahren hinaus – auch eine semiquantitative Aussage über Spuren von Hemmstoffrückständen deutlich unterhalb der Höchstmengen getroffen werden. Prinzipiell können somit anhand der relativen Signalintensität ( $S_r$ ) einer Probe folgende analytische Eingruppierungen getroffen werden

- **Eindeutig positives Resultat:** Überschreitung des halben MRL falls  $S_r < F_m$  (1/2MRL)
- Kontamination mit **geringen Konzentrationen** (in diesem Fall 5 – 50 µg/kg) falls  $F_m$  (1/2MRL)  $< S_r < F_m$  (CC $\beta$ )
- Verdacht auf **Kontamination im Spurenbereich** (in diesem Fall 0 – 5 µg/kg) falls  $F_m$  (CC $\beta$ )  $< S_r < T$
- **Eindeutig negatives Resultat:** keine detektierbaren Hemmstoffe falls  $S_r > T$

Für die praktische Anwendung sind letztlich die beiden  $F_m$ -Werte für 1/2 MRL bzw. CC $\beta$  von Bedeutung, mit denen positive Proben detektiert werden. Die theoretisch auch mögliche Bewertung der Proben anhand des Parameters  $T$  zur Identifizierung hemmstofffreier Proben, führt laut anderen Studien zu einer nicht vertretbar hohen Anzahl an falsch-positiven Resultaten (Stolker, 2012). Gleiches gilt für Proben, deren gemessene relative

Signalintensität zwischen CC $\beta$  und T liegt, die also als verdächtig für Kontaminationen im Spurenbereich eingestuft werden.

In Abschnitt D.3.2.13 ist als Nachweisvermögen mit 95 %iger Sicherheit (CC $\beta$ ) diejenige Konzentration angegeben, die als niedrigste erfolgreich getestet wurde. Für einige Einzelnachweise, insbesondere für Ceftiofur (für das aufgrund von Lagerungsinstabilität keine Versuche mit geringeren Konzentrationen durchgeführt werden konnten), aber auch für Cloxacillin, Streptomycin, Sulfamethazin und Enrofloxacin liegt das mögliche Nachweisvermögen, abgeschätzt anhand der jeweiligen Normalverteilungskurven, vermutlich noch (deutlich) niedriger.

## ***2 Vergleich mit anderen Screeningverfahren***

Die Validierung antikörperbasierter Techniken als qualitative (semi-quantitative) Screeningmethoden, deren Aufgabe es ist, eine Ja/Nein-Antwort über eine Kontamination zu geben, erfolgt in der Regel nach den von den CRL definierten Kriterien (CRL, 2010). So validierten Garcia-Fernandez et al. einen Quantum-Dot-Immunoassay für ein qualitatives Screening auf Tetrazyklin-Rückstände in Rindfleisch (Garcia-Fernandez et al., 2014), Tölgyesi et al. eine EIA-Methode zur Detektion von Chloramphenicol in Urin, Milch und Fleisch (Tölgyesi et al., 2014). Die wichtigste Eigenschaft eines Screening-Verfahrens ist dabei dessen Fähigkeit, die am häufigsten auftretenden Hemmstoffrückstände sicher bei oder unterhalb der rechtlich vorgeschriebenen Höchstmengen zu detektieren. Im Rahmen von Monitoring-Studien wie den europaweit durchgeführten Rückstandskontrollplänen, der VetCAB-Studie oder Analysen von Fleischproben aus dem Einzelhandel, werden regelmäßig – allerdings mit geringer Frequenz – Hemmstoffrückstände detektiert und identifiziert: Nicht überraschend werden diejenigen Antibiotika dabei am häufigsten gefunden, die auch mengenmäßig bei Therapie und Metaphylaxe am meisten eingesetzt werden: Tetrazykline und Penicilline, gefolgt von Sulfonamiden, Aminoglycosid- und Chinolonantibiotika (BVL, 2015; Merle et al., 2014; LGL, 2013). Ein sensitives umfassendes Screening auf all diese Antibiotika-Gruppen ist allerdings mit keinem der derzeit in der Routine etablierten (oder in der Literatur vorgeschlagenen) Verfahren möglich: Weder der in Deutschland genutzte EU-3-Plattentest noch der daraus entstandene EU-4-Plattentest (der für die sensitivere Detektion von Tetrazyklinen modifiziert wurde) können Sulfonamid- und Chinolonrückstände auf MRL-Niveau nachweisen; so wurde z.B. bei der Untersuchung von natürlich gewachsenen

Fleischproben mittels EU-4-Plattentest eine 11-fache Überschreitung der Höchstmenge für Sulfamethazin nicht erkannt (Pikkemaat et al., 2011). Auch der am europäischen Referenzlabor für Rückstände von Tierarzneimitteln entwickelte STAR-Test scheitert an der sicheren Identifizierung von niedrigen Hemmstoffkonzentrationen: Tetrazykline, Sulfonamide und Aminoglykoside werden damit erst ab 2,5 – 8-facher Grenzwertüberschreitung erkannt (Gaudin et al., 2010). Der in den Niederlanden entwickelte, ursprünglich für den Hemmstoffnachweis in Nieren konzipierte NAT kann viele antimikrobielle Substanzen auf oder unter dem (für Nieren in vielen Fällen höheren) MRL-Niveau nachweisen (einige  $\beta$ -Lactame, Sulfonamide und Macrolidantibiotika jedoch nur bei 1,5 – 5-facher Überschreitung), allerdings wurden diese Nachweisgrenzen mit Standardlösungen und nicht in Matrix ermittelt (Pikkemaat et al., 2008). Bei einem 2009 durchgeführten Ringtest, bei dem 26 europäische Untersuchungsstellen teilnahmen, wurden mit verschiedenen, bekanntermaßen analytisch problematischen, Hemmstoffen (Chinolon, Aminoglycosid, Lincosamid) auf MRL-Niveau dotierte Fleischproben unter anderem mit mikrobiologischen Methoden analysiert, wobei in 73 % der Untersuchungen falsch-negative Ergebnisse erhalten wurden (Berendsen et al., 2011). Auch in anderen Matrices aus dem Bereich der Lebensmittel zeigen mikrobielle Hemmstofftests eine ungenügende Sensitivität: Eine Vergleichsstudie zur Effektivität von fünf verbreitet genutzten mikrobiellen Hemmstoffnachweisen in Milch zeigte, dass vor allem Aminoglykoside, Makrolide und Tetrazykline nicht bei der geforderten Konzentration detektiert werden (Goffova, 2012), auch für die Matrix Honig ergab der Vergleich zweier Tests keine zufriedenstellenden Resultate (Gaudin et al., 2013).

Im Vergleich zu mikrobiellen Hemmstofftests sind antikörperbasierte Analysen (klassische EIAs, „Dip-Sticks“ und Biosensoren) in der Lage, Antibiotikarückstände (teils sehr deutlich) unterhalb der festgelegten Höchstgrenzen zu detektieren: Ein Nachweis im pg-Bereich pro ml Pufferlösung gelang beispielsweise für den Nachweis von Ciprofloxacin (Giroud et al., 2009). Der Einsatz von immunchromatographischen Methoden („Dip-Sticks“) erlaubt die schnelle (ca. 5–10 Minuten Analysezeit) Detektion von mehreren Hemmstoffrückständen in verschiedenen Lebensmittel-Matrices: So berichtete Pazzola über einen Dip-Stick zur parallelen Untersuchung von Schafsmilch auf Penicillin, Amoxicillin und Oxytetrazyklin (Pazzola et al., 2015); Heinrich et al. konnten mit einem ähnlichen Ansatz vier verschiedene

Substanzen (Chinolone, Chlorphenicol, Sulfonamide und Tylosin) in Honig detektieren (Heinrich et al., 2013). Prinzipiell ist aber aufgrund des Messprinzips der immunchromatographischen Techniken die Anzahl der gleichzeitig untersuchbaren Substanzen begrenzt. Das Spektrum der nachweisbaren Substanzen kann aber bei Einsatz von breit reagierenden, sogenannten generischen Antikörpern deutlich gesteigert werden, so ist es möglich, mit einem einzigen monoklonalen Antikörper große Teile einer Hemmstoffgruppe anhand der gemeinsamen chemischen Grundstruktur zu detektieren (Zhang et al., 2012). Der im Institut für Hygiene und Technologie produzierte Antikörper gegen Chinolone (Acaröz, 2015), der auch im Biosensor implementiert ist, ist beispielsweise in der Lage, alle MRL-belegten Chinolone deutlich unterhalb der jeweiligen Rückstandshöchstmengen zu detektieren (D.1.3). Die niedrigste Kreuzreaktivität wurde für Oxolinsäure festgestellt, in orientierenden Versuchen konnte entsprechend dotierter Fleischsaft (D.2.3), sicher bei der halben Rückstandshöchstgrenze als Hemmstoff-positiv identifiziert werden. Auch der nur für Huhn und Salmoniden zugelassene Wirkstoff Sarafloxacin (mit einer noch geringeren Kreuzreaktion) wurde in zusätzlichen orientierenden Versuchen in Fleischsaft bei einer Dotierungskonzentration von 5 µg/l detektiert. Durch den Einsatz von generischen Antikörpern wird das Nachweisspektrum also deutlich erweitert, allerdings können die einzelnen Antibiotika einer Gruppe nicht differenziert werden. Eine andere Vorgehensweise, die durch die im Gegensatz zu Dip-Sticks deutlich breiteren Multi-Analytfähigkeiten von Biosensoren ermöglicht wird, wurde von Gaudin für den Multiplexnachweis von Sulfonamiden in Honig beschrieben: Auf einen Microarray (Randox: Microarray Kit I) wurden 14 verschiedene hochspezifische Antikörper gegen Wirkstoffe aus der Sulfonamid-Gruppe sowie gegen Trimethoprim an definierte Positionen gebunden. Alle untersuchten Sulfonamide konnten unterhalb von 50 µg/kg nachgewiesen und differenziert werden (Gaudin et al., 2015a). Für ein Hemmstoffscreening ist allerdings die exakte Bestimmung des Wirkstoffs nicht nötig und verbraucht unnötigerweise Kapazitäten (hier: Spottingplätze), da für die definitive Strukturaufklärung der Substanz physikalisch-chemische Verfahren als Bestätigungsmethoden gesetzlich vorgeschrieben sind (Richtlinie EG Nr.657/2002). Diese in jedem Fall erforderlichen Bestätigungsanalysen werden bei Einsatz von Screeningverfahren, mit denen einzelne Antibiotika-Gruppen bereits identifiziert wurden, deutlich vereinfacht, da für verschiedene Substanzgruppen bei der LC-MS/MS-Analytik unterschiedliche Extraktions- und Messmethoden eingesetzt werden müssen. Generische monoklonale Antikörper mit

breitem Detektionsspektrum innerhalb einer Hemmstoffklasse, wie der in dieser Arbeit genutzte Chinolon-Antikörper, stellen in diesem Zusammenhang also die optimale Lösung dar.

Nur zwei multiplexfähige (paralleler Nachweis von drei oder mehr Analyten) Biosensorsysteme wurden bislang für den antikörperbasierten Nachweis eines breiten Hemmstoffspektrums in Fleischproben getestet: Das von der Firma Randox (Großbritannien) entwickelte und von Gaudin validierte Biosensorsystem „Evidence Investigator“ mit dem AM II-Testchip (Gaudin et al., 2015b) und der im Zuge der vorliegenden Arbeit genutzte MCR3. Im Folgenden sollen diese beiden Screeningsysteme genauer verglichen werden. Beide Systeme nutzen ein ähnliches Grundprinzip zur Detektion von Hemmstoffrückständen: Antibiotika werden durch monoklonale Antikörper erkannt, die Signalerzeugung erfolgt über Chemilumineszenz. Das nachweisbare Spektrum, die Sensitivität, die Probenvorbereitung und vor allem die Analysedauer unterscheiden sich jedoch deutlich.

Der in Tabelle 15 zusammengefasste Vergleich der Sensitivitäten für Hemmstoffe in Fleisch zeigt, dass beide Screeningsysteme in der Lage sind, Antibiotika in dotierten Proben (teils sehr deutlich) unterhalb der gesetzlich festgelegten Höchstmengen zu detektieren. Das Spektrum der analysierbaren Substanzen unterscheidet sich jedoch deutlich. Die beiden Methoden können nur jeweils eine der beiden in Deutschland meistverwendeten Hemmstoffklassen detektieren: Der MCR3 kann Rückstände von Penicillin-Antibiotika sicher unterhalb der MRLs erkennen (getestet für Penicillin G, Cloxacillin und Nafcillin; Kreuzreaktionen für Oxacillin und Dicloxacillin; aufgrund der Ergebnisse der Realprobenuntersuchung werden zudem weitere Kreuzreaktionen des gegen Penicillin G gerichteten Antikörpers mit Abbauprodukten anderer Penicilline vermutet), Tetracycline konnten jedoch innerhalb der vorliegenden Arbeit aufgrund fehlender Antikörper nicht nachgewiesen werden. Der Evidence Investigator (validiert wurde das AM II Kit) zeigt ein entgegengesetztes Bild: Kein Antibiotikum aus der Familie der Penicilline kann damit detektiert werden, dafür liefert das System für Tetracyclin und Doxycyclin sichere Ergebnisse (Chlortetracyclin und Oxytetracyclin werden über Kreuzreaktionen erkannt). Zumindest theoretisch sind jedoch mit beiden Systemen Antibiotika aus beiden Gruppen nachweisbar: So ist für das Gerät von Randox ein „Beta-Lactam Antibiotics Plus“ Microarray-Chip verfügbar, zu dem allerdings keine Studien veröffentlicht wurden (Randox, 2016). Tetracyclin

konnte in einer anderen Arbeit mit dem MCR3 bereits in Milch nachgewiesen werden (Kloth et al., 2004).

**Tabelle 15:** Vergleich des Nachweisspektrums und der Empfindlichkeit von MCR3 und Evidence Investigator AM II Kit. In der Tabelle ist das durch entsprechende Dotierungsversuche validierte Nachweisvermögen (CC $\beta$ ) der beiden Verfahren hervorgehoben; durch Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper detektierbare Hemmstoffe, für die dieser Parameter nicht experimentell bestimmt wurde, sind mit CR gekennzeichnet

	CC $\beta$ in Fleisch ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				CC $\beta$ in Fleisch ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	MRL	MCR3	AM II Kit		MRL	MCR3	AM II Kit
<b>Penicilline</b>				<b>Makrolide</b>			
Penicillin G	50	<b>25</b>	-	Tylosin	100	<b>50</b>	<b>10</b>
Cloxacillin	300	<b>30</b>	-	Tilmicosin	50	CR	<b>25</b>
Oxacillin	300	CR	-	Tylvalosin	50	CR	-
Dicloxacillin	300	CR	-				
Nafcillin	300	<b>15</b>	-	<b>Sulfonamide</b>			
				Sulfamethazin	100	<b>50</b>	-
<b>Tetrazykline</b>				Sulfadiazin	100	<b>50</b>	-
Tetrazyklin	100	-	<b>25</b>	Sulfamerazin	100	CR	-
Chlortetracyclin	100	-	CR	Sulfathiazol	100	CR	-
Doxycyclin	100	-	<b>50</b>				
Oxytetracyclin	100	-	CR	<b>Chinolone<sup>1</sup></b>			
				Marbofloxacin	150	CR	CR
<b>Cephalosporine</b>				Ciprofloxacin	100	CR	CR
Cephapirin	50	<b>50</b>	-	Enrofloxacin	100	<b>5</b>	<b>5</b>
Ceftiofur	1000	<b>500</b>	<b>10</b>	Danofloxacin	100	CR	CR
DFC		CR	<b>10</b>	Flumequin	200	CR	-
Cefquinom	50	CR	-	Difloxacin	400	CR	<b>75</b>
				Oxolinsäure	100	CR	CR
<b>Aminoglykoside</b>				Sarafloxacin	10	CR	CR
Gentamicin	50	<b>25</b>	-				
Neomycin B	500	<b>12,5</b>	-	<b>Fenicole</b>			
Streptomycin	500	<b>62,5</b>	<b>50</b>	Thiamphenicol	50	-	<b>10</b>
DHS	500	CR	<b>50</b>	Florfenicol	200	-	<b>6</b>

<sup>1</sup>Für Chinolone wurden für beide Verfahren jeweils Enrofloxacin sowie ein Vertreter der Gruppe mit der geringsten vorhandenen Kreuzreaktion getestet

Auch bei einer weiteren häufig eingesetzten Hemmstoffklasse zeigen sich Unterschiede im Analysespektrum: einige Sulfonamidrückstände (für Sulfamethazin und Sulfadiazin wurde CC $\beta$  im MCR3 bestimmt, Sulfamerazin und Sulfathiazol können über Kreuzreaktionen detektiert werden) lassen sich im MCR3 bestimmen, im AM II Kit fehlt dieser Nachweis. Mit einem anderen Kit (AM I) konnten aber Sulfonamide in Honig identifiziert werden (Popa et al., 2012). Im Hinblick auf den breiten Nachweis von Sulfonamiden-Wirkstoffen, die bei der Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren häufig eingesetzt werden, würde die Implementierung eines generischen Antikörpers bei beiden Biosensoren das Analytenspektrum deutlich erweitern. Die Herstellung solcher Antikörper wurde bereits beschrieben (Ermolenko et al., 2007; Wang et al., 2013)

Mit einer Ausnahme (keine Detektion von Flumequin mit dem AM II Kit möglich) werden alle Chinolone, für die Rückstandshöchstmengen in Fleisch von Rind und Schwein festgelegt sind, mit beiden Verfahren deutlich unterhalb der jeweiligen Höchstmengen erkannt (beide Systeme nutzen hier generische Antikörper). Da neben Enrofloxacin jeweils auch das Chinolonantibiotikum mit der geringsten Kreuzreaktivität getestet wurde, gilt der Test für alle angegebenen Chinolone als validiert (Richtlinie EG Nr.657/2002).

Bei den Nachweisen von Aminoglykosiden und Cephalosporinen deckt das in dieser Arbeit entwickelte Screening ein breiteres Spektrum ab: Zusätzlich zu den Hemmstoffen, die mit beiden Systemen erkannt werden, sind im MCR3 auch Tests für Gentamicin und Neomycin sowie Cephapirin und Cefquinom möglich. Da jedoch für den Ceftiofur-Nachweis aufgrund der Lagerungsdauer keine Dotierungsexperimente mit geringen Konzentrationen durchgeführt werden konnten, liegt CC $\beta$  in diesem Fall deutlich über dem Resultat des AM II Kits. Ein Test für Fenicole ist im MCR3 derzeit nicht implementiert, mit dem Evidence Investigator können hingegen zwei Wirkstoffe aus dieser Gruppe nachgewiesen werden. Nachweise für die Makrolidantibiotika Tylosin und Tilmicosin sind im AM II Kit verfügbar, in der vorliegenden Arbeit wurde für Tylosin das Nachweisvermögen validiert, Tylvalosin wurde in orientierenden Versuchen auf Höhe des 5  $\times$  MRL zuverlässig detektiert, zu Tilmicosin besteht nur eine geringe Kreuzreaktion (D.1.3).

Das in C.5 beschriebene Messprinzip des MCR3-Biosensors ermöglicht es, Multiplex-Analysen in deutlich kürzerer Zeit als andere Systeme durchzuführen. Insbesondere die



Tatsache, dass die Detektionsreaktion auf dem Microarray-Chip (nach 60 Sekunden Vorinkubation der Primärantikörper mit der Probe) bei sehr dünner Schichtdicke im Durchflussverfahren stattfindet (Knecht, 2004), sowie der Einsatz von Chemilumineszenz zur Signalerzeugung erlauben es, innerhalb von kurzer Zeit sichere und reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Durch den Ansatz, Haptene auf den Microarray zu spotten, können die Detektionsantikörper nach der Messphase durch Denaturierung von der Chipoberfläche gelöst und abgespült werden – der Messkanal ist nach dieser 1-minütigen Regenerationsphase für die nächste Messung bereit. Da jeder Chip zwei Durchflusskanäle enthält, kann während der Regenerationsphase des einen Kanals im anderen bereits die nächste Messung stattfinden, die absolute Analysezeit pro Probe beträgt somit in etwa sechs Minuten. Die Messung im Evidence Investigator dauert hingegen über zwei Stunden, wobei laut Hersteller bis zu neun Proben gleichzeitig auf einem Biochip-Träger und bis zu 6 Biochip-Träger parallel analysiert werden können (Randox, 2016). Angaben über die Anzahl an gleichzeitig analysierten Proben bei der Validierung des AM II Kits für den Einsatz in Fleisch waren der Literatur allerdings nicht zu entnehmen (Gaudin 2015). Auch eine Regenerierbarkeit dieser Chips, bei denen Detektionsantikörper auf die Oberfläche gespottet werden, ist bislang nicht beschrieben.

Neben einem breiten Nachweisspektrum, sowie der Fähigkeit zur Hochdurchsatzanalytik ist auch die Rate an falsch-positiven Ergebnissen ein wichtiger Faktor für die praktische Anwendbarkeit eines Screenings: Jedes (falsch-)positive Resultat erfordert eine aufwändige Bestätigungsanalyse mit physikalisch-chemischen Methoden; um die Kosten für diese Analysen in einem vertretbaren Rahmen zu halten, sollte der  $\alpha$ -Fehler (Anteil falsch-positiver Ergebnisse) so gering wie möglich ausfallen. Bedingt durch das Validierungsprinzip liegt dieser Wert bei undotierten Proben, die als Grundlage der Validierung gemessen werden, unter 5 % (Richtlinie EG Nr.657/2002). Eine Aussage über in der Praxis erhaltene  $\alpha$ -Fehler ist also nur durch die Untersuchung von Realproben nach abgeschlossener Validierung möglich. Bei mikrobiologischen Hemmstofftests liegt dieser Fehler, soweit Daten verfügbar sind, zwischen 4 % (STAR-Test) und 4,9 % (NAT-Screening) (Gaudin et al., 2010; Pikkemaat et al., 2011).

Für Multiplex-Biosensor-Verfahren wurden in der Literatur bisher keine Untersuchungen mit natürlich gewachsenen Proben beschrieben. Auch für den am europäischen Referenzlabor

für Hemmstoffrückstände validierten Evidence Investigator (Microarray Kit I und II) wurden keine Daten zur Untersuchung von natürlich gewachsenen Proben veröffentlicht. Für die mit dem MCR3 untersuchten Realproben liegt der  $\alpha$ -Fehler bei 2,2 % wenn die Einzelnachweise für die verschiedenen Hemmstoffe getrennt betrachtet werden. Die falsch-positiven Resultate werden durch die Nachweise von Tylosin und Penicillin G verursacht, bei denen die Normalverteilungskurven für dotierte und undotierte Proben nahe beieinander liegen (D.3.2.1 und D.3.2.4). Bei allen falsch-positiven Messungen für Tylosin liegt die relative Signalintensität knapp unterhalb des entsprechenden Cut-Off-Wertes (Tabelle 17). Bei den für Penicillin G falsch positiv bewerteten Ergebnissen zeigt sich ein ähnliches Bild: Die relativen Signalintensitäten liegen bis auf eine Ausnahme deutlich oberhalb derer für positive Realproben. Werden die pro untersuchter Realprobe zwölf gleichzeitig ablaufenden Einzeltests als eine Analyse betrachtet, liegt allerdings der  $\alpha$ -Fehler (für die insgesamt untersuchten 28 Proben) mit ca. 20 % deutlich höher als erwartet. Um den  $\alpha$ -Fehler zu reduzieren, sollte wie von Perme et al. beschrieben in weiteren Versuchen für diese beiden Einzelnachweise die Zielkonzentration (validiert wurde für jeweils  $\frac{1}{2}$  MRL Penicillin G und Tylosin) für die Screening-Analysen erhöht werden (Perme et al., 2010).

Insgesamt ergab die Untersuchung der natürlich gewachsenen Proben jedoch sehr zufriedenstellende Ergebnisse: In den Analysen wurden alle untersuchten Hemmstoffrückstände bei einer Konzentration entsprechend dem  $\frac{1}{2}$  MRL erfolgreich detektiert, was – wie eingangs erwähnt – im Hinblick auf einen effizienten Verbraucherschutz eine hohe Sicherheit bietet. Für die untersuchten Hemmstoffe stellt somit das in dieser Arbeit beschriebene Biosensor-Screening bei sehr kurzer Analysezeit und kostengünstiger, schneller Probenvorbereitung eine gute, mit natürlich gewachsenen Proben erfolgreich getestete, Alternative zu den etablierten Hemmstofftests dar.

Um das Einsatzgebiet des Biosensors zur Detektion von Hemmstoffrückständen zukünftig zu vergrößern, wird die Implementierung weiterer Antikörper zum Nachweis zusätzlicher Hemmstoffe angestrebt: Zwingend erforderlich ist dabei die Produktion und Anwendung eines (nach Möglichkeit generischen) mAks gegen Tetrazykline im Biosensor, um diese besonders häufig in Fleisch nachzuweisende Wirkstoff-Klasse (LGL, 2014a) sicher detektieren zu können. Gao et al. beschrieben 2013 bereits die Produktion eines solchen generischen Antikörpers zum Nachweis von 7 Tetrazyklinen (Gao, 2013). Auch generische Antikörper

gegen Sulfonamide wären wünschenswert, so dass das Spektrum der häufig angewendeten antimikrobiellen Substanzen abgedeckt werden kann. Für weitere Hemmstoffe (Amoxicillin, Ampicillin, Apramycin, Paromomycin, Cefalexin, Cefaperazon sowie Florfenicol) stehen am Lehrstuhl bereits entsprechende spezifische mAKs zur Verfügung. Denkbar wäre es, zusätzliche Nachweise neben den bereits etablierten auf einem Chip zu implementieren und so ein sehr breites Spektrum mit einer einzigen Messung innerhalb von sieben Minuten abzudecken. Des Weiteren ist auch die Adaption des Systems an zusätzliche Matrices erstrebenswert: In Vorversuchen wurde die Eignung des Biosensors für die Analyse von Nieren, Fisch, Geflügel und Shrimps getestet. Bei der Untersuchung von natürlich gewachsenen hemmstoffhaltigen Nieren wurden bereits mittels LC-MS/MS bestätigte Hemmstoffrückstände auch mit dem Biosensor identifiziert.

## ***F Zusammenfassung***

In dieser Arbeit wurde der ursprünglich für den Antibiotika-Nachweis in Milch entwickelte Biosensor MCR3 für das Screening von Fleischproben auf Hemmstoffrückstände in Fleisch evaluiert, adaptiert, validiert und mit hemmstoffhaltigen Proben aus der Routinepraxis erfolgreich getestet.

Die orientierende Evaluierung der Antikörper-basierten Einzelnachweise zeigte, dass in Pufferlösung alle implementierten Antibiotika (Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur, Gentamicin, Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Enrofloxacin) zum Teil deutlich unterhalb der jeweiligen Rückstandshöchstmengen (MRLs) detektierbar sind. Bei der Adaption des Biosensor-Verfahrens an die Matrix Fleisch konnte gezeigt werden, dass eine einfache Verdünnung des Fleischsaftes (1:5 in PBS) für die Analyse ausreichend ist, und keine aufwendigen (chemischen) Extraktionsschritte nötig sind. Anstatt der Erstellung von Standardkurven wurde die wiederholte Messung eines Referenzpuffers in den Messablauf integriert, um eine sichere Hochdurchsatzmessung über 50 aufeinanderfolgende Regenerationszyklen zu garantieren. Für die Validierung des Biosensors als qualitatives (semiquantitatives) Screeningverfahren nach EU-Richtlinie 657/2002 wurden in einer Vielzahl von Analysen dotierte und hemmstofffreie Fleischsaftproben gemessen, um so die Cut-Off-Werte für die einzelnen Antibiotika festzulegen. Diese Werte wurden auf jeweils halbem MRL-Niveau (bei Cephapirin: MRL) und bei einigen sensitiveren Nachweisen zusätzlich für deutlich geringere Konzentrationen (bis zu 1/40 MRL) ermittelt. Bei diesen empfindlicheren Einzelnachweisen ermöglicht das Biosensor-basierte Analyseverfahren somit neben einer qualitativen Hemmstoffidentifizierung auch semiquantitative Aussagen über die in der Probe vorhandenen Rückstands-Konzentrationen.

Belastete Fleischproben (n = 28) aus Routineuntersuchungen, deren Rückstandsbelastung am LGL Erlangen mittels LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert worden war, wurden im Biosensor erneut getestet. Die Screeningergebnisse für diese Proben, die ein breites Spektrum von (Mehrfach-)Rückständen verschiedener antimikrobieller Substanzen enthielten, entsprachen den LC-MS/MS Analysen und belegten die praktische Anwendbarkeit der Methode. In den Proben wurden insgesamt acht Wirkstoffe zuverlässig identifiziert, der Anteil falsch-positiver Ergebnisse lag bei 2,2 %, falsch-negative Analysen traten nicht auf.

## ***G Summary***

### **Rapid semiquantitative screening for antibiotic residues in meat**

In this study the biosensor MCR3, which was originally developed for the detection of antibiotics in milk, was evaluated, adapted and validated for the screening of meat for antimicrobial residues. Finally, the applicability of the developed screening assay was demonstrated by the analyses of incurred samples.

An evaluation study of the antibody-based assays showed that each of the implemented antibiotics (penicillin G, cloxacillin, nafcillin, cephalosporin, ceftiofur, gentamicin, neomycin B, streptomycin, tylosin, sulfadiazine, sulfamethazine and enrofloxacin) could be detected well below the respective maximum residue levels. Adapting the biosensor-method to the matrix meat it became apparent, that a mere dilution of meat juice (1:5 in PBS) is sufficient for the analysis and that no complex (chemical) extraction was needed. During the biosensor tests, no standard curves were established but, rather, the 50 applied repetitive analyses cycles were interspersed with measurements of a reference buffer to ensure the reliable high throughput analyses of meat samples. In order to validate the biosensor as a qualitative (semi-quantitative) screening method according to EU-directive 657/2002, a multitude of measurements of contaminated and inhibitor-free meat juice samples were carried out to determine the specific cut-off-values for each antibiotic. These values were established at 0.5× MRL values for each single antimicrobial (1× MRL was used for cephalosporin) and, in addition, depending on the test sensitivity also for considerably lower concentrations (down to 1/40<sup>th</sup> MRL). Thus, besides the qualitative identification of residues, the biosensor-based screening-technique also enables semi-quantitative estimations of the residue concentrations in a sample.

Incurred samples (n =28), collected during routine-screening, were analysed using LC-MS/MS at the Bavarian Health and Food Safety Authority. These samples, containing a wide range of (multiple) antibiotic residues, were retested in the biosensor. The obtained screening results matched the data obtained by the confirmatory method and thus proved the applicability of the method for real samples. Eight different substances were reliably detected in the incurred samples; the ratio of false-positive results was 2.2 %, no false-negative results were obtained.

## ***H Literaturverzeichnis***

ACARÖZ, U. (2015): Entwicklung und Anwendung von generischen monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln, Diss. Med. Vet., München.

AAV LmH: Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung von Hygienevorschriften für Lebensmittel und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis, BAnz. Nr. 178a vom 25. November 2009

BERENDSEN, B. J. A., M. G. PIKKEMAAT & L. A. M. STOLKER (2011): Are antibiotic screening approaches sufficiently adequate? A proficiency test, *Analytica Chimica Acta*, 685, 170-175.

BITTENCOURT, M. S., M. T. MARTINS, F. G. S. DE ALBUQUERQUE, F. BARRETO & R. HOFF (2012): High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure, *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 29, 508-516.

BOGAERTS, R. & F. WOLF (1980): A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat, *Fleischwirtschaft*, 60. Jg., Nr. 4, pp. 662-674

BREMUS, A., R. DIETRICH, L. DETTMAR, E. USLEBER & E. MÄRTLBAUER (2012): A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 503-515.

BRICENO-FEREIRA, E. D., E. R. ASCANIO-EVANOFF, J. G. RIERA-BETANCOURT, D. ARRIETA-MENDOZA, S. A. FLORES-CHONA & G. C. MANIGLIA-MERIDA (2010): Evidence of chloramphenicol residues in pigs kidney sample of the central region of Venezuela, *Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, 20, 254-258.

BUNDESTIERÄRZTEKAMMER (2015): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Arzneimitteln (Stand 2015),  
[http://www.bundestieraerztekammer.de/downloads/btk/leitlinien/Antibiotika-Leitlinien\\_01-2015.pdf](http://www.bundestieraerztekammer.de/downloads/btk/leitlinien/Antibiotika-Leitlinien_01-2015.pdf) (abgerufen am 03.03.2016)

- BVL (2014): Jahresbericht zum Nationalen Rückstandskontrollplan 2013, [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/08\\_nrkp\\_erkp/nrkp2013\\_bericht.pdf](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_erkp/nrkp2013_bericht.pdf) (abgerufen am 03.03.2016)
- BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (2015): Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin sinkt weiter [https://www.bvl.bund.de/DE/08\\_PresseInfothek/01\\_FuerJournalisten/01\\_Presse\\_und\\_Hintergrundinformationen/05\\_Tierarzneimittel/2015/2015\\_07\\_28\\_pi\\_Antibiotikaabgabemenge2014.html](https://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2015/2015_07_28_pi_Antibiotikaabgabemenge2014.html) (abgerufen am 03.03.2016)
- CAMMAN, K. (2001a): Dynamische Konzentrationen – on-line-Analytik mit Sensoren, In: CAMMAN, K. (ed.) Instrumentelle Analytische Chemie 9-15, Spektrum, Heidelberg, ISBN 3-8274-0057-0
- CAMMAN, K. (2001b): Molekülspektrometrie, In: CAMMAN, K. (ed.) Instrumentelle Analytische Chemie 5-35, Spektrum, Heidelberg, ISBN 3-8274-0057-0
- CANTWELL, H. & M. O'KEEFFE (2006): Evaluation of the Premi (R) Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney, Food Additives and Contaminants, 23, 120-125.
- CEPURNIEKS, G., J. RJABOVA, D. ZACS & V. BARTKEVICS (2015): The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole - Orbitrap mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 102, 184-192.
- CONZUELO, F., V. R. V. MONTIEL, S. CAMPUZANO, M. GAMELLA, R. M. TORRENTE-RODRIGUEZ, A. J. REVIEJO & J. M. PINGARRON (2014a): Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors, Analytica Chimica Acta, 820, 32-38.
- CONZUELO, F., J. VIVEKANANTHAN, S. POLLER, J. M. PINGARRON & W. SCHUHMANN (2014b): Immunologically controlled biofuel cell as a self-powered biosensor for antibiotic residue determination, ChemElectroChem, 1, 1854-1858.
- CRL (Community Reference Laboratories Residues) (2010): Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer), pp. 1-18, [http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs\\_vetmedresidues\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_vetmedresidues_guideline_validation_screening_en.pdf) (abgerufen am 03.03.2016)

DASENAKI, M. E. & N. S. THOMAIDIS (2015): Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 880, 103-121.

EFSA (European Food Safety Authority) 2015a: ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food producing animals,  
[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/4006.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4006.pdf)  
(abgerufen am 11.01.2016)

EFSA (European Food Safety Authority) (2015b): Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products,  
[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/723e.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/723e.pdf)  
(abgerufen am 11.01.2016)

ER, B., F. K. ONURDAG, B. DEMIRHAN, S. O. OZGACAR, A. B. OKTEM & U. ABBASOGLU (2013): Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef sold in the markets of Ankara, Turkey, *Poultry Science*, 92, 2212-2215.

ERMOLENKO, D. N., S. A. EREMIN, A. A. MART'IANOV, A. V. ZHERDEV & B. B. DZANTIEV (2007): A new generic enzyme immunoassay for sulfonamides *Analytical Letters*, 40, 1047-1062.

FERNANDEZ, F., K. HEGNEROVA, M. PILIARIK, F. SANCHEZ-BAEZA, J. HOMOLA & M. P. MARCO (2010): A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1231-1238.

FERNANDEZ, F., F. SANCHEZ-BAEZA & M. P. MARCO (2012): Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 151-158.

FU, Y. L., M. M. PAN & S. J. SUN (2013): Detection of sulfamethazine residues in milk by surface plasmon resonance-based biosensor inhibition immunoassay, *Industrial Instrumentation and Control Systems*, Pts 1-4, 241-244, 852-857.

GAO, F., G. X. ZHAO, H. C. ZHANG, P. WANG & J. P. WANG (2013): Production of monoclonal antibody against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk, *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 48, 92-100.



GARCIA-FERNANDEZ, J., L. TRAPIELLA-ALFONSO, J. M. COSTA-FERNANDEZ, R. PEREIRO & A. SANZ-MEDEL (2014): A quantum dot-based immunoassay for screening of tetracyclines in bovine muscle, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1733-1740.

GAUDIN, V., C. HEDOU & E. VERDON (2009): Validation of a wide-spectrum microbiological tube test, the EXPLORER (R) test, for the detection of antimicrobials in muscle from different animal species, *Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 26, 1162-1171.

GAUDIN, V., A. DE COURVILLE, C. HEDOU, A. RAULT, S. E. DIOMANDE, C. CREFF-FROGER & E. VERDON (2013): Evaluation and validation of two microbiological tests for screening antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods, *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 30, 234-243.

GAUDIN, V., C. HEDOU, C. SOUMET & E. VERDON (2014): Evaluation and validation of biochip multi-array technology for the screening of six families of antibiotics in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines, *Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 31, 1699-1711.

GAUDIN, V., C. HEDOU, C. SOUMET & E. VERDON (2015a): Evaluation and validation of a biochip multi-array technology for the screening of 14 sulphonamide and trimethoprim residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for veterinary medicines, *Food and Agricultural Immunology*, 26, 477-495.

GAUDIN, V., C. HEDOU, C. SOUMET & E. VERDON (2015b): Evaluation and validation of a multi-residue method based on biochip technology for the simultaneous screening of six families of antibiotics in muscle and aquaculture products, *Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 33, 403-419.

GAUGAIN-JUHEL, M., B. DELEPINE, S. GAUTIER, M. P. FOURMOND, V. GAUDIN, D. HURTAUD-PESSEL, E. VERDON & P. SANDERS (2009): Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach, *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 26, 1459-1471.

GENTILI, A., D. PERRET & S. MARCHESE (2005): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 24, 704-733.

GIROUD, F., K. GORGY, C. GONDRAN, S. COSNIER, D. G. PINACHO, M. P. MARCO & F. J. SANCHEZ-BAEZA (2009): Impedimetric immunosensor based on a polypyrrole-antibiotic model film for the label-free picomolar detection of ciprofloxacin, *Analytical Chemistry*, 81, 8405-8409.

GOFFOVA, Z. S., I. KOZAROVA, D. MATE, S. MARCINCAK, Z. GONDOVA & D. SOPKOVA (2012): Comparison of Detection Sensitivity of Five Microbial Inhibition Tests for the Screening of Aminoglycoside Residues in Fortified Milk, *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 314-320.

GRANELLI, K. & C. BRANZELL (2007): Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 586, 289-295.

GRONOVER, A. & E. WOHNLICH (1929): Über die chemische und physikalische Untersuchung von Fleisch und Fleischsaft verschiedener Tiere und über die Feder'sche Verhältniszahl, *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*, 57. Band, Juni 1929, 592-604.

GULLBERG, E., L. M. ALBRECHT, C. KARLSSON, L. SANDEGREN & D. I. ANDERSSON (2014): Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals, *Mbio*, 5, DOI 10.1128/mbio.01918-14.

GULLBERG, E., S. CAO, O. G. BERG, C. ILBACK, L. SANDEGREN, D. HUGHES & D. I. ANDERSSON (2011): Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations, *Plos Pathogens*, 7, DOI 10.1371/journal.ppat.1002158.

HEINRICH, K., R. MACARTHUR, C. VON HOLST & M. SHARMAN (2013): An inter-laboratory validation of a multiplex dipstick assay for four classes of antibiotics in honey, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 7875-7884.

HURTAUD-PELSEL, D., T. JAGADESHWAR-REDDY & E. VERDON (2011): Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument, *Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28, 1340-1351.

KAUFMANN, A., P. BUTCHER, K. MADEN & M. WIDMER (2008): Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2 µm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1194, 66-79.

KLOTH, K., R. NIESSNER & M. SEIDEL (2009a): Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2106-2112.

KLOTH, K., M. RYE-JOHNSEN, A. DIDIER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, R. NIESSNER & M. SEIDEL (2009b): A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk, *Analyst*, 134, 1433-1439.

KNECHT, B. G., A. STRASSER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, R. NIESSNER & M. G. WELLER (2004): Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk, *Analytical Chemistry*, 76(3), 646-654.

KOENENDIERICK, K., L. OKERMAN, L. DEZUTTER, J. M. DEGROODT, J. VANHOOF & S. SREBRNIK (1995): A one-plate microbiological screening-test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat - an alternative to the EEC 4-Plate Method, *Food Additives and Contaminants*, 12, 77-82.

KROKER, R. (1999): Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen, pp. 211-246 In: LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH & R. KROKER (eds.) *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, Enke, Stuttgart, ISBN 978-3830411239.

LAFLEUR, J. P., A. JONSSON, S. SENKBEIL & J. P. KUTTER (2016): Recent advances in lab-on-a-chip for biosensing applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 213-233.

LAMAR, J. & M. PETZ (2007): Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices, *Analytica Chimica Acta*, 586, 296-303.

LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel) (2013a): Erfassung von Antibiotikarückständen in ausgewählten Lebensmitteln tierischer Herkunft, Band 4 der Schriftenreihe Lebensmittelsicherheit in Bayern, pp 20-23, ISBN 978-3-942018-55-5.

LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel) (2013b): Hemmstofftest-Nachuntersuchungen, Jahresbericht 2012, pp 63-64, ISBN 978-3-942018-80-7.

LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel) (2013c): Hemmstofftest-Nachuntersuchungen. Jahresbericht 2013, pp. 63-64, ISBN 978-3-945332-03-0.

LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel) (2015a): Auswertung der Abgabemengen von Antibiotika in Bayern, Jahresbericht 2014, p.185, ISBN 978-3-945332-40-5.

LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel) (2015b): Hemmstofftest-Nachuntersuchungen. Jahresbericht 2014, pp. 87-88, ISBN 978-3-945332-40-5.

LEE, M. H., H. J. LEE & P. D. RYU (2001): Public health risks: Chemical and antibiotic residues – Review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 14, 402-413.

LENGGER, S., J. OTTO, D. ELSAESSER, O. SCHNEIDER, A. TIEHM, J. FLEISCHER, R. NIESSNER & M. SEIDEL (2014): Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, Phi X174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 3323-3334.

LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch): Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. Juni 2013 (BGBl. I S.1426), das durch Artikel 1 der Verordnung vom 26. Januar 2016 (BGBl. I S. 108) geändert worden ist, [http://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/\\_\\_\\_10.html](http://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/___10.html) (abgerufen am 04.03.2016)

LMÜV (Tierische Lebensmittel-Überwachungsverordnung): Verordnung zur Regelung bestimmter Fragen der amtlichen Überwachung des Herstellens, Behandelns und Inverkehrbringens von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, Bundesgesetzblatt I, pp. 1816, 1864.

LOPES, R. P., D. V. AUGUSTI, A. G. M. OLIVEIRA, F. A. S. OLIVEIRA, E. A. VARGAS & R. AUGUSTI (2011): Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis, Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 28, 1667-1676.

MATA, L., D. SANZ & P. RAZQUIN (2014): Validation of the Explorer (R) 2.0 test coupled to e-Reader (R) for the screening of antimicrobials in muscle from different animal species, Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 31, 1496-1505.

MAURUS, Y. (2016): Persönliche Mitteilung.

MC NAUGHT, D. & A. WILKINSON (1997): Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), <http://goldbook.iupac.org/B00663.html> (abgerufen am 25.02.2016).

MERLE, R., Y. MOLLENHAUER, P. HAJEK, M. ROBANUS, C. HEGGER-GRAVENHORST, W. HONSCHA, A. KASBOHRER & L. KREIENBROCK (2013a): Monitoring of antibiotic consumption in cattle on agricultural farms, Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 126, 318-325.

MERLE, R., Y. MOLLENHAUER, P. HAJEK, M. ROBANUS, C. HEGGER-GRAVENHORST, W. HONSCHA, A. KASBOHRER & L. KREIENBROCK (2013b): Monitoring of antibiotic consumption in pigs on agricultural farms, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 126, 326-332.

MEYER, V. K., C. KOBER, R. NIESSNER & M. SEIDEL (2015): Regeneration of recombinant antigen microarrays for the automated monitoring of antibodies against zoonotic pathogens in swine sera, *Sensors (Basel)*, 15, 2614-2628.

MOMPELAT, S., M. P. FOURMOND, M. LAURENTIE, E. VERDON, D. HURTAUD-PESSEL & J. P. ABJEAN (2015): Validation of a liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix, *Journal of Chromatography A*, 1407, 119-129.

MUNGROO, N. A. & S. NEETHIRAJAN (2014): Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-a review, *Biosensors (Basel)*, 4, 472-493.

MYLLYNIEMI, A. L., L. NUOTIO, E. LINDFORS, R. RANNIKKO, A. NIEMI & C. BACKMAN (2001): A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples, *Analyst*, 126, 641-646.

MYLLYNIEMI, A. L., R. RANNIKKO, E. LINDFORS, A. NIEMI & C. BACKMAN (2000): Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues, *Food Additives and Contaminants*, 17, 991-1000.

MYLLYNIEMI, A. L., R. RINTALA, C. BACKMAN & A. NIEMI (1999): Microbiological and chemical identification of antimicrobial drugs in kidney and muscle samples of bovine cattle and pigs, *Food Additives and Contaminants*, 16, 339-351.

NGUYEN, H. H., J. PARK, S. KANG & M. KIM (2015): Surface Plasmon Resonance: A versatile technique for biosensor applications, *Sensors (Basel)*, 15, 10481-10510.

NOUWS, J., H. VAN EGMOND, I. SMULDERS, G. LOEFFEN, J. SCHOUTEN & H. STEGEMAN (1999): A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels, *International Dairy Journal*, 9, 85-90.

OKERMAN, L., J. VAN HOOF & W. DEBEUCKELAERE (1998): Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets, *Journal of Aoac International*, 81, 51-56.

- OSWALD, S., X. KARSUNKE, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, R. NIESSNER & D. KNOPP (2013): Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 6405-6415.
- PAZZOLA, M., G. PIRAS, A. NOCE, M. L. DETTORI & G. M. VACCA (2015): Evaluation of the rapid assay Betastar Combo 3.0 for the detection of Penicillin, Amoxicillin, Cefazolin and Oxytetracycline in individual sheep milk, *Small Ruminant Research*, 124, 127-131.
- PERME, T., M. BIZJAK, K. S. GACNIK & A. KIRBIS (2010): Validation of TwinsensorBT, screening test for the detection of beta-lactams and Tetracyclines in milk, and comparison to Delvotest (R) SP-NT, *Slovenian Veterinary Research*, 47, 97-106.
- PIKKEMAAT, M. G. (2009): Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 893-905.
- PIKKEMAAT, M. G., S. O. V. DIJK, J. SCHOUTEN, M. RAPALLINI & H. J. VAN EGMOND (2008): A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening), *Food Control*, 19, 781-789.
- PIKKEMAAT, M. G., M. L. B. A. RAPALLINI, T. ZUIDEMA, J. W. A. ELFERINK, S. OOSTRA-VAN DIJK & W. D. M. DRIESSEN-VAN LANKVELD (2011): Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the Premi (R) Test (applied to muscle and kidney), *Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28, 26-34.
- POPA, I. D., E. C. SCHIRIAC, S. MATIUT & R. CUCIUREANU (2012): Method validation for simultaneous determination of 12 Sulfonamides in honey using biochip array technology, *Farmacia*, 60, 143-154.
- RAKOTOHARINOME, M., D. POGNON, T. RANDRIAMPARANY, J. C. MING, J. P. IDOUMBIN, E. CARDINALE & V. PORPHYRE (2014): Prevalence of antimicrobial residues in pork meat in Madagascar, *Tropical Animal Health and Production*, 46, 49-55.
- RANDOX (2016): Evidence Investigator, <http://www.randox.com/wp-content/uploads/delightful-downloads/2015/10/LT107.pdf> (abgerufen am 03.03.2016)
- RENTON, K. W. (2001): Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation, *Pharmacology & Therapeutics*, 92, 147-163.

Richtlinie EG Nr. 657/2002 (2002): zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, Amtsblatt Nr. L 221 vom 17/08/2002, S. 0008 - 0036

RODA, A., M. MIRASOLI, E. MICHELINI, M. DI FUSCO, M. ZANGHERI, L. CEVENINI, B. RODA & P. SIMONI (2016): Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review, *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 164-179.

RYE-JOHNSEN, M. (2008): Development of a regenerable hapten-microarray for the rapid parallel detection of antibiotics in milk, Master Thesis, Technische Universität München.

SCHNEIDER, M. J., K. MASTOVSKA & M. B. SOLOMON (2010): Distribution of penicillin G residues in culled dairy cow muscles: implications for residue monitoring, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5408-5413.

SEIDEL, M. & R. NIESSNER (2014): Chemiluminescence microarrays in analytical chemistry: a critical review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 5589-5612.

SIPOVA, H. & J. HOMOLA (2013): Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review, *Analytica Chimica Acta*, 773, 9-23.

STEAD, S., S. RICHMOND, M. SHARMAN, J. STARK & E. GEIJP (2005): A new approach for detection of antimicrobial drugs in food Premi((R))Test coupled to scanner technology, *Analytica Chimica Acta*, 529, 83-88.

STOLKER, A. A. M. (2012): Application of EU guidelines for the validation of screening methods for veterinary drugs, *Drug Testing and Analysis*, 4, 28-33.

SUAREZ, G., Y. H. JIN, J. AUERSWALD, S. BERCHTOLD, H. F. KNAPP, J. M. DISERENS, Y. LETERRIER, J. A. E. MANSON & G. VOIRIN (2009): Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk, *Lab on a Chip*, 9, 1625-1630.

SZKOLA, A., E. M. LINARES, S. WORBS, B. G. DORNER, R. DIETRICH, E. MAERTLBAUER, R. NIESSNER & M. SEIDEL (2014): Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay, *Analyst*, 139, 5885-5892.

TANG, J. S. & P. M. GILLEVET (2003): Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 995-997.

THEVENOT, D. R., K. TOTH, R. A. DURST & G. S. WILSON (1996): International Union of Pure and Applied Chemistry - Physical chemistry division, steering committee on biophysical chemistry - Analytical chemistry division, commission V.5 (Electroanalytical chemistry) - Electrochemical biosensors: Proposed definitions and classification - Synopsis of the report, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 30, 81-81.

THEVENOT, D. R., K. TOTH, R. A. DURST & G. S. WILSON (2001): Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Analytical Letters*, 34, 635-659.

TÖLGYESI, A., J. FEKETE, V. K. SHARMA, E. PALFFI, K. BEKESI, D. LUKONICS & G. PLEVA (2014): A Lc- Ms/Ms confirmatory method for determination of chloramphenicol in real samples screened by competitive immunoassay, *Acta Alimentaria*, 43, 306-314.

VAN BOECKEL, T. P., C. BROWER, M. GILBERT, B. T. GRENFELL, S. A. LEVIN, T. P. ROBINSON, A. TEILLANT & R. LAXMINARAYAN (2015): Global trends in antimicrobial use in food animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 5649-5654.

VAN BOECKEL, T. P., S. GANDRA, A. ASHOK, Q. CAUDRON, B. T. GRENFELL, S. A. LEVIN & R. LAXMINARAYAN (2014): Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of Cross Mark 742 national pharmaceutical sales data, *Lancet Infectious Diseases*, 14, 742-750.

VAN RENNINGS, L., C. VON MUNCHHAUSEN, M. HARTMANN, H. OTTILIE, W. HONSCHA, A. KASBOHRER & L. KREIENBROCK (2014): Antibiotic usage and antibiotic sales in Germany in 2011-the situation of drug usage in veterinary medicine, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 127, 366-374.

Verordnung (EG) Nr.37/2010 (2010): über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, *Amtsblatt L 15* vom 20.1.2010, S. 1–72.

Verordnung (EG) Nr. 470/2009 (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, *Amtsblatt L 152* vom 16.6.2009, S. 11–22.



Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 (1990): zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs, Amtsblatt L 224 vom 18.8.1990, S. 1–8.

WACHECK, S., C. WERRES, U. MOHN, S. DORN, E. SOUTSCHEK, M. FREDRIKSSON-AHOMAA & E. MÄRTLBAUER (2012): Detection of IgM and IgG Against Hepatitis E Virus in Serum and Meat Juice Samples from Pigs at Slaughter in Bavaria, Germany, *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, 655-660.

WALLMANN, J., A. BENDER, I. REIMER & T. HERBERER (2015): Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2014, *Deutsches Tierärzteblatt*, 1260-1265.

WANG, Z. H., R. C. BEIER, Y. J. SHENG, S. X. ZHANG, W. X. JIANG, Z. P. WANG, J. WANG & J. Z. SHEN (2013): Monoclonal antibodies with group specificity toward sulfonamides: selection of hapten and antibody selectivity, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 4027-4037.

WIKI, M. & R. E. KUNZ (2000): Wavelength-interrogated optical sensor for biochemical applications, *Optics Letters*, 25, 463-465.

WISE, R. (2002): Antimicrobial resistance: priorities for action, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 585-586.

WUTZ, K. (2015): Entwicklung eines Immunochips zur simultanen Detektion von Antikörpern gegen zoonotische Pathogene in Schweineseren, Diss. rer. nat., Technische Universität München.

WUTZ, K., R. NIESSNER & M. SEIDEL (2011): Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays, *Microchimica Acta*, 173, 1-9.

YAMAGUCHI, T., M. OKIHASHI, K. HARADA, Y. KONISHI, K. UCHIDA, M. H. N. DO, H. D. T. BUI, T. D. NGUYEN, P. DO NGUYEN, V. VAN CHAU, K. T. VAN DAO, H. T. N. NGUYEN, K. KAJIMURA, Y. KUMEDA, C. T. BUI, M. Q. VIEN, N. H. LE, K. HIRATA & Y. YAMAMOTO (2015a): Antibiotic residue monitoring results for pork, chicken, and beef samples in Vietnam in 2012-2013, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5141-5145.

YAMAGUCHI, T., M. OKIHASHI, K. HARADA, K. UCHIDA, Y. KONISHI, K. KAJIMURA, K. HIRATA & Y. YAMAMOTO (2015b): Rapid and easy multiresidue method for the analysis of antibiotics in meats by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5133-5140

ZHANG, H. Y., S. WANG & G. Z. FANG (2011): Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays, *Journal of Immunological Methods*, 368, 1-23.

## ***I Abkürzungsverzeichnis***

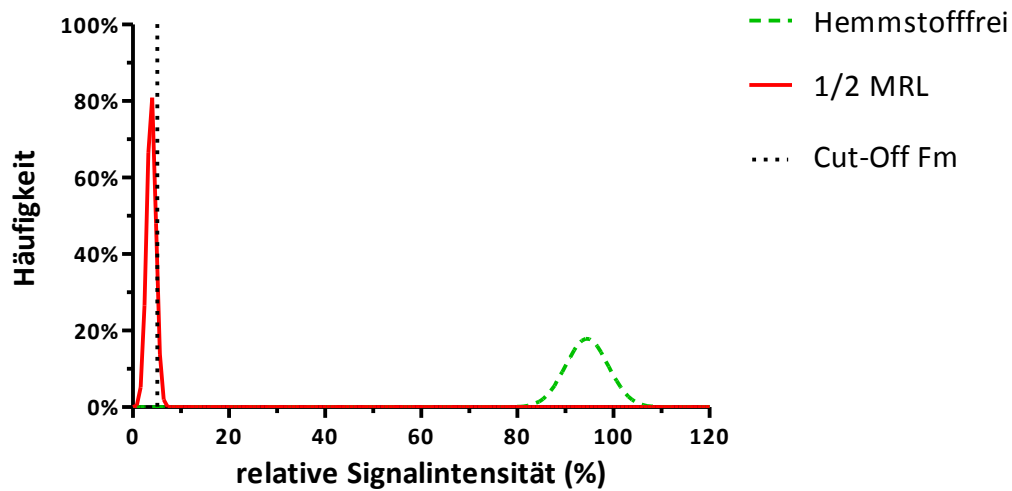
a.u.	Arbitrary Units (willkürlich gewählte Einheit für die Signalintensität)
$\alpha$ -Fehler	Prozentualer Anteil falsch-positiver Ergebnisse
AVV LmH	Allgemeine Verwaltungsvorschrift Lebensmittelhygiene
B	Mittelwert der relativen Signalintensitäten der hemmstofffreien Proben
$\beta$ -Fehler	Prozentualer Anteil falsch-negativer Ergebnisse
BSA	Bovines Serumalbumin
BTK	Bundestierärztekammer
CCD	Charge-Coupled-Device
CC $\beta$	Kleinste mit $\beta$ -Fehler detektierbare Konzentration
CR	Kreuzreaktivität
DFC	Desfuroylceftiofur (-Cystein Disulfid)
Fm	Cut-Off-Wert (Grenzwert für hemmstoffhaltige Proben)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IC <sub>50</sub>	Testmittelpunkt
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel
M	Mittelwert der relativen Signalintensitäten der hemmstoffhaltigen Proben
mAk	Monoklonaler Antikörper
MCR3	Microarray Chip Reader, 3. Generation
MRL	Maximum Residue Limit
NAT	Nouws Antibiotic Test
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

---

S	Absolute Signalintensität
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SPR	Surface Plasmon Resonance
Sr	Relative Signalintensität
T	Threshold (Grenzwert für hemmstofffreie Proben)
Tier-LMÜV	Tierische Lebensmittel – Überwachungsverordnung
VetCAB	Veterinary Consumption of Antibiotics
VK	Variationskoeffizient
WIOS	Wavelength Interrogated Optical Sensor

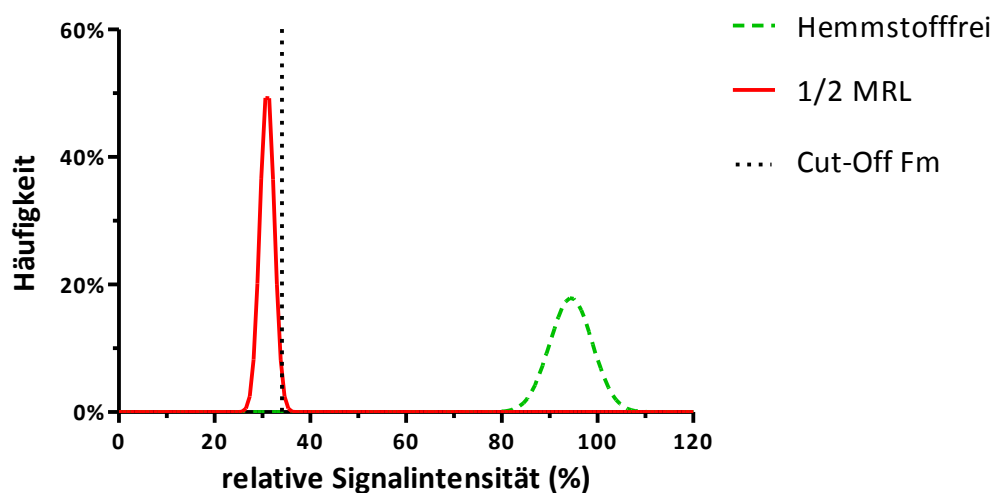
## J Zusätzliche Abbildungen

### Dicloxacillin

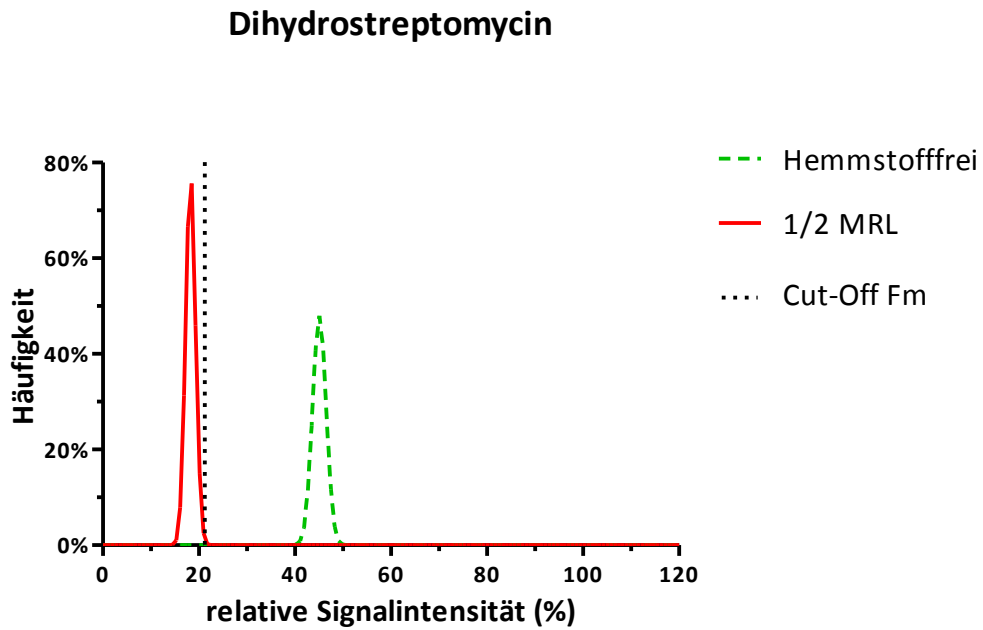


**Abbildung Z1:** Dicloxacillin, über Kreuzreaktivität des mAk für Cloxacillin nachgewiesen. Mit dem 1/2 MRL dotierter Fleischsaft ist eindeutig von Hemmstoff-freiem zu diskriminieren

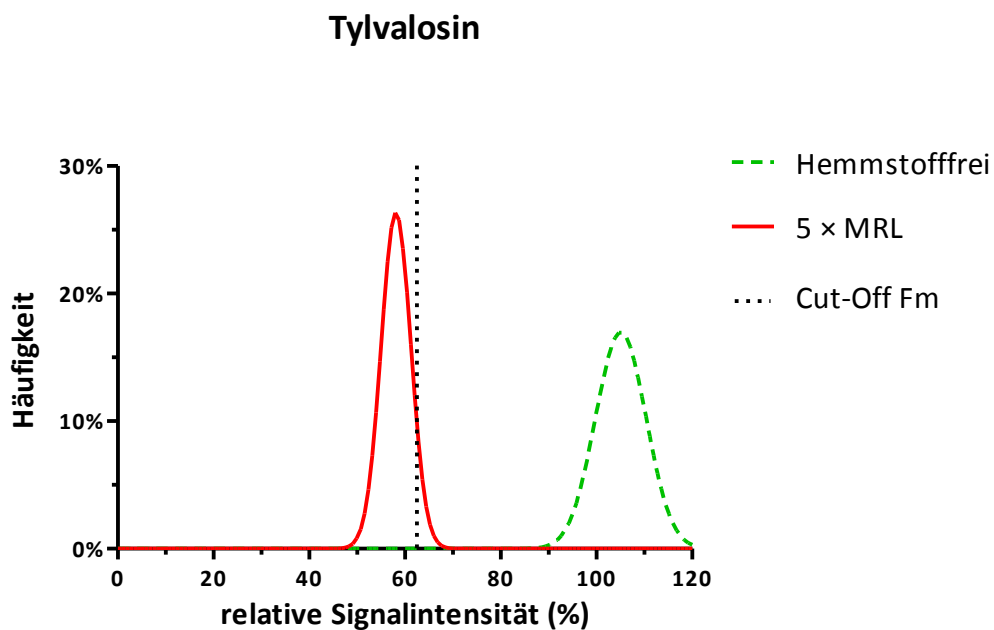
### Oxacillin



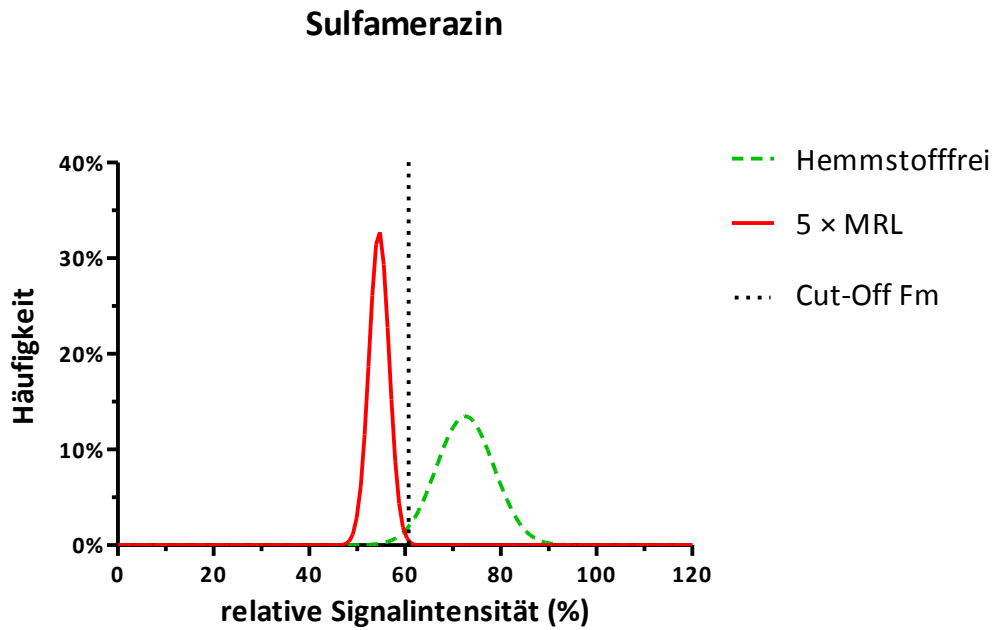
**Abbildung Z2:** Oxacillin kann ebenfalls bei 1/2 MRL sicher über die Kreuzreaktivität erkannt werden



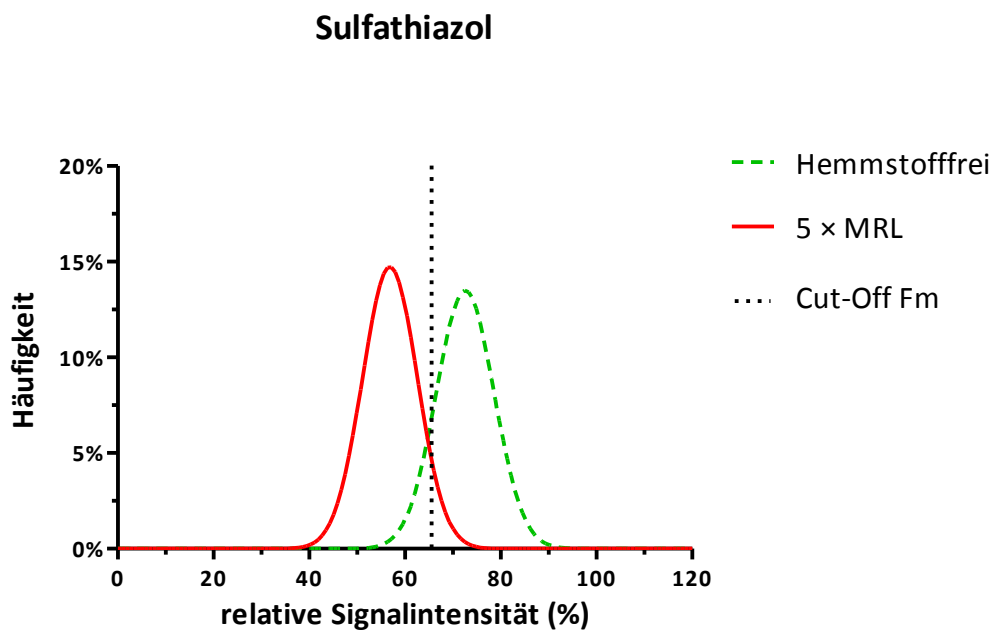
**Abbildung Z3:** Dihydrostreptomycin wird über eine Kreuzreaktion des Streptomycin-Antikörpers erkannt und ist bei halbem MRL detektierbar



**Abbildung Z4:** Die Kreuzreaktion des Tylosin-Antikörpers zu Tylvalosin (38 %) ermöglicht es, hohe Rückstandskonzentrationen des Makrolid-Antibiotikums zu detektieren.

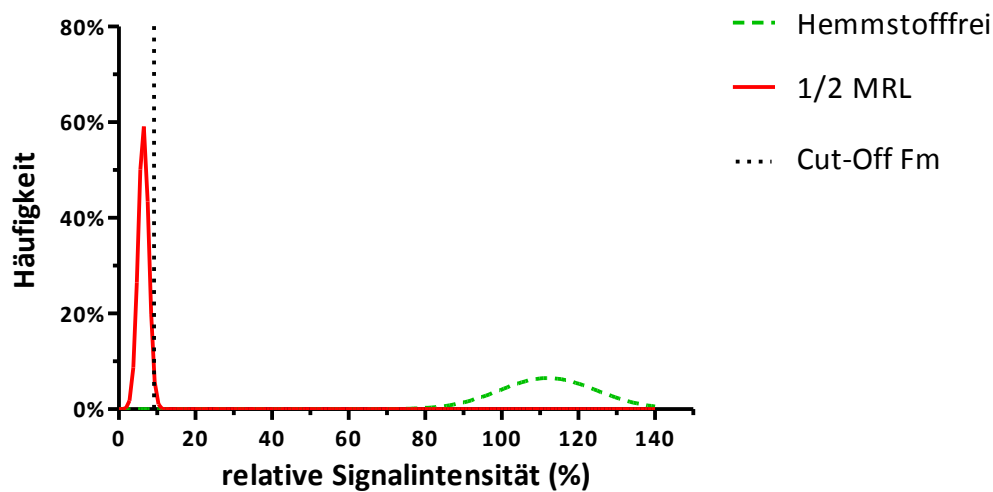


**Abbildung Z5:** Sulfamerazin wird bei 5-facher Höchstmengensüberschreitung durch den mAk gegen Sulfadiazin erkannt



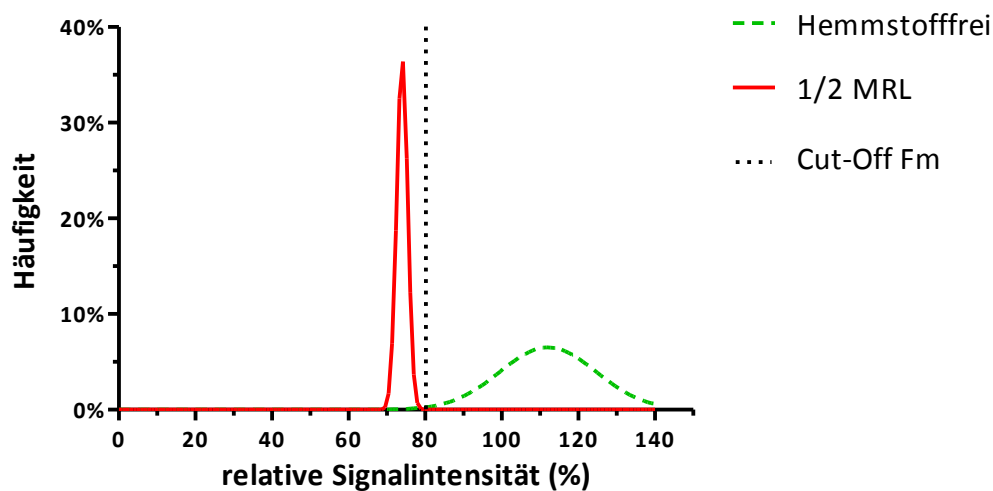
**Abbildung Z6:** Der Nachweis von Sulfathiazol (15 % Kreuzreaktivität des Sulfadiazin-Antikörpers) ist bei einer hohen Dotierungskonzentration (5 × MRL) möglich, es sind allerdings viele falsch-positive Ergebnisse zu erwarten.

### Oxolinsäure



**Abbildung Z7:** Der generische Antikörper gegen Chinolone kann Oxolinsäure sehr sicher bei 1/2 MRL detektieren.

### Sarafloxacin



**Abbildung Z8:** Sarafloxacin, für das nur für Hähnchen und Salmoniden eine Rückstandshöchstgrenze festgelegt ist, wurde in orientierenden Versuchen (n=17 Messungen) bei einer Konzentration von 5 µg/l in Fleischsaft von Rind und Schwein nachgewiesen.



## ***K Abbildungsverzeichnis***

Abbildung 1: Grundprinzip von SPR-Biosensoren.....	17
Abbildung 2: Enzymkatalysierte Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Peroxid.....	18
Abbildung 3: Messprinzip des Antibiotikanachweises im MCR3-biosensor.....	28
Abbildung 4: CCD-Aufnahme eines Microarray-Chips.....	29
Abbildung 5: Aufbau des Biosensors.....	30
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Validierung eines Screeningverfahrens anhand von Punktwolken.....	34
Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Validierung eines Screeningverfahrens anhand von Normalverteilungskurven.....	35
Abbildung 8: Standardkurven für die auf dem Chip implementierten Nachweise von Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur und Gentamicin.....	38
Abbildung 9: Standardkurven für die auf dem Chip implementierten Nachweise von Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfamethazin, Sulfadiazin und Enrofloxacin.....	39
Abbildung 10: Abfall der Messsignale für die auf den Chip implementierten Nachweise für Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur und Gentamicin.....	42
Abbildung 11: Abfall der Messsignale für die auf den Chip implementierten Nachweise für Neomycin B, Streptomycin, Tylosin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Enrofloxacin.....	43
Abbildung 12: Einfluss der Probenmatrix eines hemmstofffreien Fleischsaftes.....	49
Abbildung 13: Vergleich der Matrixeffekte für Fleischsaft von Rind und Schwein.....	51
Abbildung 14: Referenzmessungen wurden genutzt, um den durch Signalverringern entstehenden Fehler zu verringern.....	52
Abbildung 15: Validierung des Penicillin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	56
Abbildung 16: Validierung des Cloxacillin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	57
Abbildung 17: Validierung des Cloxacillin-Nachweises bei einer Konzentration von 30 µg/kg.....	58

---

Abbildung 18: Validierung des Nafcillin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	59
Abbildung 19: Validierung des Nafcillin-Nachweises bei einer Konzentration von 15 µg/kg.....	60
Abbildung 20: Validierung des Cephapirin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	61
Abbildung 21: Validierung des Biosensor-basierten Cephapirin-Nachweises auf MRL-Niveau.....	63
Abbildung 23: Validierung des Gentamicin-Nachweises in fleischproben mittels Biosensor.....	64
Abbildung 24: Validierung des Neomycin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	65
Abbildung 25: Validierung des Neomycin-Nachweises bei einer Konzentration von 12,5 µg/kg.....	66
Abbildung 26: Validierung des Streptomycin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	67
Abbildung 27: Validierung des Streptomycin-Nachweises bei einer Konzentration von 62,5 µg/kg.....	68
Abbildung 28: Validierung des Tylosin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	69
Abbildung 29: Validierung des Sulfamethazin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	70
Abbildung 30: Validierung des Sulfadiazin-Nachweises in Fleischproben mittels Biosensor.....	71
Abbildung 31: Validierung des Enrofloxacin-Nachweises in Fleischproben mittels Bioeonsor.....	73
Abbildung 32: Validierung des Enrofloxacin-Nachweises bei einer Konzentration von 5µg/kg.....	74

**Abbildungen im Anhang**

Abbildung Z1: Dicloxacillin, über Kreuzreaktivität des mAk für Cloxacillin nachgewiesen .....	116
Abbildung Z2: Oxacillin kann bei 1/2 MRL sicher über die Kreuzreaktivität erkannt werden.....	117
Abbildung Z3: Dihydrostreptomycin wird über eine Kreuzreaktion des Antikörpers gegen Streptomycin erkannt.....	117
Abbildung Z4: Die Kreuzreaktion des Tylosin-Antikörpers zu Tylvalosin (38 %).....	118
Abbildung Z5: Sulfamerazin wird bei 5-facher Höchstmengenüberschreitung durch den mAk gegen Sulfadiazin erkannt .....	118
Abbildung Z6: Der Nachweis von Sulfathiazol (15 % Kreuzreaktivität des mAk für Sulfadiazin) ist bei einer hohen Dotierungskonzentration (5 × MRL) möglich.....	119
Abbildung Z7: Der generische Antikörper gegen Chinolone kann Oxolinsäure sehr sicher bei 1/2 MRL detektieren.....	119
Abbildung Z8: Sarafloxacin, für das nur für Huhn und Salmoniden eine Rückstandshöchstgrenze festgelegt ist.....	120

## ***L Tabellenverzeichnis***

Tabelle 1: Für Muskulatur der Tierarten Rind bzw. Schwein festgelegte Rückstandshöchstmengen nach EU-Verordnung 37/2010.....	8
Tabelle 2: Übersicht über einige häufig genutzte mikrobielle Hemmstofftests.....	12
Tabelle 3: Aktuelle Publikationen, in denen physikalisch-chemische Techniken als Screeningmethoden präsentiert werden.....	15
Tabelle 4: Chip-basierte Nachweise von Hemmstoffen mit dem Biosensor Evidence Investigator (Randox, Vereinigtes Königreich).....	20
Tabelle 5: Einsatz des Biosensors MCR3 in der Lebensmittelanalytik.....	21
Tabelle 9: Testempfindlichkeiten des Biosensor-Systems zum Nachweis von Hemmstoffen in Pufferlösung (in 1 % Casein/PBS).....	37
Tabelle 10: Reduktion der im Biosensor gemessenen relativen Signalintensität in Abhängigkeit von der Anzahl der Regenerationszyklen.....	41
Tabelle 11: Kreuzreaktionen (CR) des Chinolon-Antikörpers.....	44
Tabelle 12: Relevante Kreuzreaktionen der für die Biosensor-basierten Analysen eingesetzten Antikörper.....	46
Tabelle 13: Entscheidungsgrenzen für das Hemmstoffscreening in Fleischsaft.....	76
Tabelle 14: Über Kreuzreaktionen zusätzlich detektierbare Antibiotika.....	77
Tabelle 15: Untersuchung auf Verschleppung nach hemmstoffhaltigen Proben.....	79
Tabelle 16: Untersuchung von natürlich gewachsenen Proben mit Rückständen oberhalb der halben Rückstandshöchstmenge.....	83
Tabelle 17: Untersuchung von natürlich gewachsenen Proben mit Rückständen unterhalb der halben Rückstandshöchstmenge.....	84
Tabelle 18: Vergleich des Nachweisspektrums und der Empfindlichkeit von MCR3 und Evidence Investigator AM II kit.....	96

## ***M Danksagung***

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich

bei Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer, für die Bereitstellung des aktuellen Themas sowie das ausgezeichnete Arbeitsumfeld mit moderner Ausstattung und guter Stimmung im Team,

bei Dr. Ritchie Dietrich, für die immer wieder motivierende Unterstützung bei der wissenschaftlichen Bearbeitung des Themas, sowie für die unermüdliche Korrekturarbeit insbesondere in den Wochen vor der Abgabe,

bei Dr. Holtmanspötter und Dr. Götz-Schmidt, LGL Erlangen, für die Bereitstellung der hemmstoffhaltigen Realproben,

bei Dr. Michael Seidel und Susi Mahler, für die Möglichkeit am IWC Variationen der Microarray-Chips herzustellen,

bei Dr. Maria Knauer, die mich während ihrer Zeit am Lehrstuhl und darüber hinaus mit großem Engagement betreut hat, für ihre Hilfe und die beständige freundschaftliche Verbundenheit,

bei PD Dr. Christina Hölzel, für die „Starthilfe“ beim Schreiben und ihre Freundschaft,

bei Angela Tischler, die alles kann und alles weiß,

bei Eva Scharinger, für die Diskussion über Inhalt und Sprache unserer Dissertationen,

bei Dr. Andrea Didier und Dr. Kristina Schauer, für die Beantwortung hunderter kleiner Fragen,

beim ganzen Team der Milchhygiene, insbesondere bei Ulas Acaröz und Wenbo Yu, für die tolle Zusammenarbeit und die gute Zeit,

bei Uli Neumann, für Motivation und Rat,

sowie bei meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung in allen Bereichen.