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

Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch mittels Schnelltestsystemen

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

von

Brigitte Quandt

aus
Amberg

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Mansfeld

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG……...**1**

2 SCHRIFTTUM…… **2**

2.1 Rückstände von Antiinfektiva in Milch…… **2**

2.1.1 Allgemeines……***2***

2.1.2 Toxikologische und technologische Risiken…….....***3***

2.1.3 Rechtliche Grundlagen……..***5***

2.2 Charakteristische Eigenschaften einiger Antiinfektiva…… **7**

2.2.1 Beta-laktam-Antibiotika…… ***7***

2.2.1.1 Allgemeines…… 7

2.2.1.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum…….. 7

2.2.2 Sulfonamide und Trimethoprim……***8***

2.2.2.1 Allgemeines…… 8

2.2.2.2. Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum…….. 9

2.2.3 Tetracycline……***10***

2.2.3.1 Allgemeines…… 10

2.2.3.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum…….. 10

2.2.4 Aminoglykoside und Makrolide…… ***11***

2.2.4.1 Allgemeines…… 11

2.2.4.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum…….. 11

2.2.5 Chinolone ***13***
2.2.5.1 Allgemeines 13
2.2.5.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum 13

2.3 Nachweis von Antiinfektiva in Kuhmilch **14**

2.3.1 Mikrobiologische Hemmstofftests ***15***
2.3.1.1 Allgemeines 15
2.3.1.2 Modifizierter Agardiffusionstest mit *E. coli* *16*

2.3.2 Schnelltestsysteme ***17***
2.3.2.1 Allgemeines 17
2.3.2.2 Charm II 17
2.3.2.3 Charm ROSA 18
2.3.2.4 Parallux 19
2.3.2.5 Funktionsprinzip des Biosensor-Prototyps („Immunomat“) 20
2.3.2.6 Weitere kommerziell erhältliche Schnelltestsysteme und Biosensoren 21

2.3.3 Physikalisch-chemische und enzymimmunologische Nachweisverfahren ***22***

2.4 Nachweis von Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch **23**

2.4.1 Bedeutung von Schaf-, Ziegen und Kamelmilch ***23***

2.4.2 Anwendbarkeit kommerzieller Nachweisverfahren auf Schaf-, Ziegen und Kamelmilch ***24***

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN…… **26**

3.1 Materialien und Geräte…… **26**

3.1.1 Chemikalien und Biochemika……... ***26***

3.1.2 Antibiotika und Sulfonamide…… ***26***

3.1.3 Puffer und Lösungen……***28***

3.1.4 Immunreagenzien……..***29***

3.1.5 Spezielle Geräte……..***29***

3.1.6 Software……..***30***

3.1.7 Spezielle Materialien und Reagenzien……..***30***

3.1.8 Testsysteme……***31***

3.1.9 Mikrobiologische Testsysteme……...***31***

3.1.10 Probenmaterial……...***31***

3.2 Untersuchungen und Ergebnisse…… **32**

3.2.1 Methodische Grundlagen…….. ***32***

3.2.1.1 Herstellung der Stammlösungen und Probenvorbereitung……..… 32

3.2.1.2 Handhabung und Auswertung der Testsysteme……..32

3.2.1.2.1 Charm II…….....33

3.2.1.2.2 Charm ROSA……..35

3.2.1.2.3 Parallux……... 36

3.2.1.2.4 Immunomat……37

3.2.1.2.5 Mikrobiologische Testsysteme……... 38
3.2.1.2.6 Modifizierter Agardiffusionstest mit *E. coli*……...39

3.2.2 Untersuchungen zur Funktionalität der verschiedenen Testsysteme……..39
3.2.2.1 Gegenüberstellung der wichtigsten Parameter……39
3.2.2.2 Vorversuche für die Messungen mittels Immunomat…….42
3.2.2.2.1 Erstellung eines „Spottingprotokolls“…… 42
3.2.2.2.2 Überprüfung möglicher Reaktionen zwischen Antikörpern und Festphasenantigenen gleicher Substanzklassen…….. 44
3.2.2.2.2.1 Durchführung……..44
3.2.2.2.2.2 Ergebnisse……... 44
3.2.2.2.3 Entwicklung eins instrumentellen Auswerteverfahrens für die Messergebnisse des Immunomaten…….44
3.2.2.3 Untersuchungen zur Haltbarkeit der Testergebnisse…….. 46
3.2.2.4 Überprüfung des Einflusses von Patentblau auf die Schnelltestsysteme……49
3.2.2.4.1 Probenmaterial und Durchführung…… 49
3.2.2.4.2 Ergebnisse……...49
3.2.2.5 Überprüfung des Einflusses von Penicillinase auf die Schnelltestsysteme……... 50
3.2.2.5.1 Probenmaterial und Durchführung…… 50
3.2.2.5.2 Ergebnisse……...50

3.2.3 Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der Testsysteme…….. 51
3.2.3.1 Mikrobiologische Hemmstofftestsysteme…….. 51
3.2.3.1.1 Durchführung……..51
3.2.3.1.2 Ergebnisse……...51
3.2.3.2 Schnelltestsysteme…….. 58
3.2.3.2.1 Durchführung……..58
3.2.3.2.2 Ergebnisse……...59

3.2.4 Überprüfung des Einflusses der Milchbeschaffenheit auf die Schnelltestsysteme……..73
3.2.4.1 Überprüfung des Einflusses von pH-Wert-Veränderungen auf die Schnelltestsysteme…….. 74
3.2.4.1.1 Herstellung des Probenmaterials und Durchführung……..74

3.2.4.1.2 Ergebnisse……...74
3.2.4.2 Überprüfung des Einflusses einer erhöhten Keimzahl auf die Schnelltestsysteme……..79
3.2.4.2.1 Herstellung des Probenmaterials und Durchführung……..79
3.2.4.2.2 Ergebnisse……...79
3.2.4.3 Überprüfung des Einflusses eines erhöhten Zellgehaltes auf die Schnelltestsysteme…… 80
3.2.4.3.1 Probenmaterial und Durchführung…… 80
3.2.4.3.2 Ergebnisse……...80

3.2.5 Überprüfung der Anwendbarkeit der Schnelltestsysteme auf Milch anderer Tierarten……..83
3.2.5.1 Probenmaterial und Durchführung…… 83
3.2.5.2 Ergebnisse…….. 83
3.2.5.2.1 Untersuchung von Schafmilch……83
3.2.5.2.2 Untersuchung von Ziegenmilch……..83
3.2.5.2.3 Untersuchung von Kamelmilch…….…… 84

3.2.6 ***Validierung der Schnelltestsysteme anhand hemmstoffpositiver und hemmstofffreier Praxisproben…….…..86***
3.2.6.1 Probenmaterial und Durchführung…….…… 86
3.2.6.2 Ergebnisse…….. 86

4 DISKUSSION……91

4.1 Funktionalität der Schnelltestsysteme…… 91

4.1.1 Geräte……..... 91

4.1.2 Testreagenzien……92

4.1.3 Testdurchführung……..92

4.2 Sensitivität und Spezifität der Testsysteme……94

4.3 Einfluss der Milchbeschaffenheit auf die Testsysteme……..96

4.4 Beeinflussbarkeit der Schnelltestsysteme durch das Enzym Penicillinase oder den Farbstoff Patentblau……..……...97

4.5 Anwendbarkeit der Schnelltestsysteme auf die Milch anderer Tierarten……....98

4.6 Validierung der Schnelltestsysteme anhand BRT-positiver und BRT-negativer Praxisproben…….....98

5 ZUSAMMENFASSUNG……....101

6 SUMMARY…….....102

7 LITERATURVERZEICHNIS……...103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ampi	Ampicillin
BSA	Bovines Serumalbumin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CCD	Charge coupled device
Cepha	Cephapirin
Cloxa	Cloxacillin
DC	Dünnschichtchromatographie
Ery	Erythromycin
GC	Gaschromatographie
Genta	Gentamycin
GlcOx	Glukoseoxidase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HS	Hemisuccinat
Konz	Konzentration
mAB	Monoclonal Antibody, monoklonaler Antikörper
MRL	Maximum Residue Limits
MS	Massenspektrometrie
Neo	Neomycin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Ovalbumin
Ox	Oxidase
PABA	Para-Aminobenzoesäure
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
Pen	Penicillin
PJ	Perjodat
POD	Peroxidase
SDA	Sulfadiazin
SMA	Sulfamethazin
Strep	Streptomycin
Testsens	Testsensitivität
TNT	Trinitrotoluol

1 EINLEITUNG

Rückstände von Antiinfektiva in Milch haben aufgrund ihrer potentiellen Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher sowie ihres störenden Einflusses auf die Herstellung fermentierter Milchprodukte noch immer große Bedeutung für die Milchwirtschaft. Um diese Risiken zu minimieren, wurden alle zum Einsatz bei lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Antiinfektiva im Rahmen der Verordnung (EWG) 2377/90 mit Rückstandshöchstmengen belegt. Die Einhaltung dieser Höchstmengen wird in der Praxis vor allem mittels mikrobiologischen Hemmstofftests überprüft. Allerdings verfügen diese häufig nicht über die notwendigen Nachweisgrenzen, benötigen lange Inkubationszeiten und ermöglichen eine Identifizierung des entsprechenden Antiinfektivums nur begrenzt. Eine Alternative stellen diverse Schnelltests dar. Obwohl ihr Einsatz in der Praxis mittlerweile weit verbreitet ist, sind aber nur wenige von ihnen in der Lage, neben Beta-laktamen auch andere Antiinfektiva-Klassen zu erfassen. Da aus genannten rechtlichen und technologischen Gründen jedoch möglichst viele Antibiotika- und Sulfonamid-Rückstände erfasst werden sollten, wurden in den letzten Jahren verschiedene Testkits mit umfangreicheren Nachweisspektren entwickelt und z.T. kommerzialisiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die kommerziell erhältlichen Testsysteme Charm II (Charm Sciences Inc., USA), Charm ROSA (Charm Sciences Inc., USA) und Parallux™ (IDEXX Laboratories, USA) sowie einen Biosensor-Prototyp („Immunomat“, TU und LMU, München) unter Einbeziehung herkömmlicher mikrobiologischer Hemmstofftests vergleichend auf ihre Fähigkeit zur Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch zu überprüfen.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Landwirtschaft und Forsten gefördert.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Rückstände von Antiinfektiva in Milch

2.1.1 Allgemeines

Neben Rückständen von Pestiziden, Umweltkontaminanten und diversen Futterzusatzstoffen, sind die derzeit bedeutsamsten Rückstände in der Milch die Tierarzneimittelrückstände. Ihr Anteil am Weltmarkt für Tierarzneimittel betrug Mitte der Neunziger Jahre 44 % des Gesamtverkaufs, davon 29,9 % an westeuropäische Länder (FEDESA, 1998). Eine große Rolle spielen vor allem die Rückstände antimikrobiell wirksamer Substanzen, also Antiinfektiva. In Deutschland betrug ihr Marktanteil 2003 fast 30 %, wobei 53 % der Umsätze im Nutztiersegment erwirtschaftet wurden (BFT, 2004).

Laut Bericht des Milchprüfrings e.V. enthielten fast 0,2 % der im Jahr 2004 in Bayern getesteten Milchproben Hemmstoffe (MILCHPRÜFRING, 2005). Im Jahr 2002 dagegen betrug der Anteil der hemmstoff-positiv getesteten Proben 0,05 % (Tätigkeitsbericht MPR, 2002). Die Tatsache, dass hiervon 94 % Penicillin enthielten, aber nur 6 % andere Antiinfektiva zeigt deutlich, dass die Beta-laktame, allen voran die Penicilline, nach wie vor am häufigsten eingesetzt werden. Sie stellen deshalb die wichtigste Substanzgruppe unter den Tierarzneimittelrückständen dar.

Antiinfektiva anderer Substanzklassen sind aber ebenfalls von großer Bedeutung. SUHREN et al. (1996) fanden bei der Untersuchung hemmstoff-positiver Tankmilchproben durch den Einsatz des mikrobiologischen Delvotest SP mit vorläufigen Bestätigungstests (PABA) immerhin zu fast 30 % Sulfonamid-Rückstände. MITCHELL et al. (1998) weisen auf eine in Nordamerika durchgeführte Studie hin, welche mittels Einsatz empfindlicherer Nachweisverfahren eine Kontamination von Konsummilch zu 75 % mit Tetracyclinen, Sulfamethazin und anderen Nicht-Beta-laktamen ergab. 1997 gab es laut SCHWARZ et al. (2001) eine Veröffentlichung der FEDESA/FEFANA zum Antibiotikaverbrauch zu medizinischen Zwecken in der EU und der Schweiz, laut der insgesamt 3494 Tonnen Antibiotika bei Tieren eingesetzt wurden. Davon waren 66 % Tetracycline, 12 % Makrolide, 9 % Penicilline, 4 % Aminoglykoside, 2 % Sulfonamide/Trimethoprim, 1 % Fluorchinolone und 5 % Antibiotika anderer Klassen (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001). Auch aktuellere Studien besagen, dass Nicht-Penicilline, wie zum Beispiel Cephalosporine, allen

voran das Ceftiofur, oder wiederum Tetracycline und Chemotherapeutika wie Sulfonamide/Trimethoprim immer häufiger von Veterinären eingesetzt werden und deshalb zunehmend milchhygienisch bedeutsam sind (CARS et al., 2001; ZWALD et al., 2004).

2.1.2 Toxikologische und technologische Risiken

Grundsätzlich bestehen bei einem Vorliegen von Tierarzneimittelrückständen in der Milch sowohl toxikologische als auch technologische Risiken. Unter toxikologischen Risiken versteht man vor allem den Einfluss dieser Rückstände auf die menschliche Gesundheit, wohingegen mit technologischen Risiken der Einfluss von Tierarzneimittelrückständen auf die Herstellung von fermentierten Milchprodukten im Milchverarbeitungsbetrieb gemeint ist.

Ein für den Verbraucher bedeutsames toxikologisches Risiko durch mit Antiinfektiva kontaminierte Milch und Milchprodukte ist die Auslösung von Allergien. Als Hauptursache für die Auslösung von Allergien beim Menschen gelten bis heute noch die Beta-laktam-Antibiotika (TORRES et. al., 2003), wobei die Penicillinallergie die häufigste und bislang am gründlichsten erforschte Allergie ist (WOODWARD, 1991; DAYAN, 1993; ROMANO et. al, 2000). Aber auch allergische Reaktionen auf Cephalosporine oder Clavulansäure kommen durchaus vor und gewinnen aufgrund des zunehmenden Einsatzes dieser Antibiotika immer mehr an Wichtigkeit (FERNANDEZ-RIVAS et al., 1995; WARRINGTON und MCPHILLIPS, 1996; ROMANO et. al., 2000; BLANCA et. al., 2002). Des Weiteren wird von Allergien gegen Tetracycline oder Makrolide nach dem Konsum von mit Rückständen belasteten Lebensmitteln berichtet (WOODWARD, 1991). Zudem wird auf Studien hingewiesen, bei denen das allergene Potential anderer Antiinfektiva, z. B. wiederum das der Tetracycline oder auch das der Sulfonamide oder Aminoglykoside untersucht wurde (DAYAN, 1993). Reaktionen auf die Aufnahme von Antibiotika können sofort oder verspätet eintreten, mögliche klinische Symptome reichen von mehr oder weniger schweren Hautreaktionen bis zum anaphylaktischen Schock (WOODWARD, 1991; BLANCA et. al. 2002).

Ein weiterer Aspekt im Zusammenhang mit dem Einsatz von Antiinfektiva bei Tieren ist die zunehmende Verschärfung der bakteriellen Resistenzlage (WALSH, 2000; WIERUP, 2000; LATHERS, 2001; MORRIS und MASTERSON, 2002). Zwar gibt es Anzeichen dafür, dass tierärztlicher Antibiotikaeinsatz nur zu einem sehr geringen Prozentsatz für die

Resistenzproblematik in der Humanmedizin verantwortlich ist, die Rolle des Tieres als Reservoir für resistente Gene oder resistente pathogene Bakterienstämme wird jedoch stetig diskutiert (SCHWARZ et al., 2001). Laut WEGENER (2003) spielt bei der Entwicklung von Bakterien-Resistenzen im Tier die Verabreichung von Antibiotika in subtherapeutischer Dosis an lebensmittelliefernde Tiere, vor allem in Form von Wachstumsförderern, die wichtigste Rolle. Er betont jedoch ebenfalls, dass vor allem jene Antiinfektiva Resistenzen bilden und fördern, welche zusätzlich zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Resistente Bakterienstämme können auch bei mangelhafter Melkhygiene in die Milch und so in die Lebensmittelkette gelangen und ihre ausgebildeten Resistenzen an die menschliche Mikroflora weitergeben. Als besonders bedeutsame antibiotikaresistente Zoonoseerreger gelten *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Campylobacter* spp. und *Enterococcus* spp., wobei hier der Ursprung der ausgebildeten Resistenzen beim Tier als gesichert gilt (SCHWARZ et al., 2001; TEUBER, 2001).

Neben der Weitergabe von Resistenzen auf „direktem“ Weg, also über die Aufnahme bakteriell kontaminierter Milch, wird außerdem die potentielle Weitergabe von Resistenzen an „nicht-pathogene“, kommerziell in der Herstellung von fermentierten Milchprodukten verwendete „Starter-Kulturen“ diskutiert. Dabei wurde festgestellt, dass viele der Mikroorganismen zwar noch keine Resistenzen ausgebildet haben, aber potentielle zukünftige Resistenzträger sein können. Schon fertig ausgebildete Resistenzen gegen Streptomycin und Ciprofloxacin wurden bei diversen *Lactobacillus* spp. nachgewiesen (KATLA et. al., 2001).

Tierarzneimittelrückstände in Milch und Milchprodukten sind für die menschliche Mikroflora jedoch nicht nur im Hinblick auf die unerwünschte Ausbildung von Resistenzen bedeutsam, sondern bergen noch andere gesundheitliche Risiken. Wird die Mikroflora wiederholt niedrigen Antibiotika-Dosen ausgesetzt, wie sie beispielsweise in mit Rückständen kontaminierten Lebensmitteln vorliegen können, so kann es durch Absterben der „erwünschten“ Keimflora des Intestinaltraktes zu einer Verschiebung des empfindlichen Gleichgewichtes kommen. Hierdurch steigt das Risiko einer Ansiedelung „unerwünschter“ Mikroorganismen, also pathogener Mikroorganismen wie Salmonellen oder *Escherichia (E.) coli* (CERNIGLIA und KOTARSKI, 1999).

WEBB et al. (2003) halten auch die Aufnahme pharmakologisch wirksamer Stoffe über das Grundwasser für eine potentielle Gefährdung der menschlichen Gesundheit. Hier wird in

diesem Zusammenhang auf die Möglichkeit einer Wiederherstellung der pharmakologischen und allergenen Effekte bereits metabolisierter Antiinfektiva durch Umkehr der Metabolisierung in den Kläranlagen aufmerksam gemacht.

Neben den gesundheitlichen, toxikologischen Risiken gibt es auch technologische Risiken, welche vor allem in Milchverarbeitungsbetrieben große Probleme bereiten können. Eine Verarbeitung von mit Antiinfektiva belasteter Milch zu fermentierten Milchprodukten wie Joghurt und Joghurterzeugnissen, Butter- oder Sauermilcherzeugnissen und Käse, kann zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen, da diese Rückstände die Milchsäurebakterien schädigen oder sogar abtöten können (BEYER, 1986; SCHIFFMANN et al., 1992). Zwar wird der Zerfall der Antibiotika-Rückstände in der Milch durch verschiedene Schritte im Herstellungsprozess, wie beispielsweise Hitzebehandlung vor der Kulturzugabe, den Fermentationsprozess an sich oder die Bindung der Stoffe an Milchproteine, begünstigt, ihr antimikrobieller Effekt auf die Starterkulturen bleibt jedoch unverändert (GRUNWALD und PETZ, 2003). Die Folgen sind mangelnde Aromabildung, sensorische Veränderungen oder Fehler bei der Käseherstellung, welche den Genusswert der fertigen Produkte herabsetzen oder diese sogar ungenießbar machen.

2.1.3 Rechtliche Grundlagen

Das **Arzneimittelgesetz** verpflichtet nach § 58 (Anwendung bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen) u.a. Tierhalter (also den Milcherzeuger) zu einem verantwortungsvollen und ordnungsgemäßen Umgang mit Tierarzneimitteln. Das **Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz** (LMBG) als übergeordnetes Regelwerk über den Verkehr mit Lebensmitteln verbietet diesem nach § 15, Abs. 1 und 2 zudem die von seinen Tieren gewonnenen Lebensmittel, also auch die Milch, in Verkehr zu bringen, wenn in ihnen Tierarzneimittelrückstände enthalten sind, deren Menge die festgelegten Höchstmengen überschreitet oder wenn die ihnen auferlegten Wartezeiten nicht eingehalten wurden. In § 15, Abs. 1 wird hierbei auf die **Verordnung (EWG) Nr. 2377/90** des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs verwiesen. Diese besitzt vier Anhänge, wobei Anhang I Stoffe mit endgültigen Höchstmengen enthält, Anhang II Stoffe, deren Rückstände für den Verbraucher in allen Konzentrationen unbedenklich sind,

Anhang III Stoffe, für die vorläufige Höchstmengen für maximal fünf Jahre festgelegt wurden und Anhang IV die Stoffe, für die keine unbedenklichen Höchstmengen festgelegt werden konnten und deren Anwendung bei allen lebensmittelliefernden Tieren EU-weit verboten ist. Die Höchstmengen werden als „**M**aximum **R**esidue **L**imits“ (MRL-Werte) bezeichnet. Sie markieren die höchste, noch zu akzeptierende Konzentration, in welcher ein Arzneimittel unter Berücksichtigung gesundheitlicher und nahrungsmitteltechnologischer Aspekte im Lebensmittel vorliegen darf.

Des Weiteren verpflichtet die **Milchverordnung** als Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis in § 16 den Be- und Verarbeitungsbetrieb zu betriebseigenen Kontrollen, bei denen er sich unter anderem zu vergewissern hat, dass in seinem Produkt keine Tierarzneimittelrückstände in derartigen Mengen vorhanden sind, dass sie die Gesundheit des Verbrauchers gefährden oder die Eigenschaften des Produktes schädigen können.

Wie die Qualitätsbezahlung zu erfolgen hat, regelt die **Milch-Güteverordnung (Milch-Güte VO)**. Diese schreibt im Rahmen der Güteprüfung von Anlieferungsmilch nach § 2 Abs. 3 mindestens zwei Untersuchungen pro Monat zur Feststellung von „Hemmstoffen“ vor. Ein positiver „Hemmstoffbefund“ wird laut dieser Verordnung mit einem Milchgeldabzug geahndet (HEESCHEN, 1993), welcher derzeit 5 Cent/kg beträgt. Eine Identifizierung und Quantifizierung des Hemmstoffes, die zu lebensmittelrechtlichen Konsequenzen führen würde, ist nach der Milch-Güte VO nicht vorgesehen.

Zu Beginn des Jahres 2006 tritt ein neues „EU-Hygienepaket“ mit drei Verordnungen (VO (EG) Nr. 852, Nr. 853 und Nr. 854) in Kraft. VO 853/2004 enthält spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Unbeschadet der Richtlinie 96/23/EG müssen die Lebensmittelunternehmer mit geeigneten Verfahren sicherstellen, dass Rohmilch nicht in Verkehr gebracht wird, wenn ihr Gehalt an Rückständen von Antibiotika über den zugelassenen Mengen für einen der Stoffe der Anhänge I und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 liegt oder die Gesamtrückstandsmenge aller antibiotisch wirksamen Stoffe den höchstzulässigen Wert überschreitet. Genügt Rohmilch diesen Anforderungen nicht, so müssen Lebensmittelunternehmer dies der zuständigen Behörde melden und durch geeignete Maßnahmen Abhilfe schaffen.

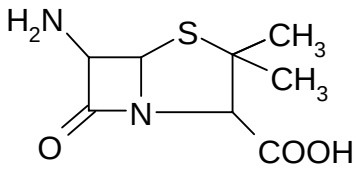
2.2 Charakteristische Eigenschaften einiger Antiinfektiva

2.2.1 Beta-laktam-Antibiotika

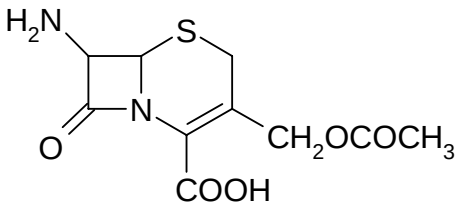
2.2.1.1 Allgemeines

Zur Gruppe der Beta-laktam-Antibiotika gehören die in der Veterinärmedizin hauptsächlich eingesetzten Penicilline und Cephalosporine sowie die hauptsächlich in der Humanmedizin eingesetzten Carbapeneme und Monobactame (GOOTZ, 1990).

Durch die Beobachtung der antibakteriellen Wirkung eines zufällig auf einer Blutplatte gewachsenen Schimmelpilzes, gelang Alexander Fleming im Jahre 1929 die Entdeckung eines Naturstoffes, welchen er nach der Gattung des Schimmelpilzes (*Penicillium notatum*) Penicillin nannte (FLEMING, 1929). Die Forschungen von Florey und Chain zur Gewinnung von Penicillin aus *Penicillium*-Kulturen ermöglichten seinen breiten Einsatz während des zweiten Weltkrieges. Das erste Cephalosporin wurde 1945 von Brotzu aus Kulturen von *Cephasporium acremonium* isoliert. Heute werden zahllose Cephalosporine hauptsächlich synthetisch hergestellt. Pharmakologisch werden sie in Abhängigkeit von ihrem in-vitro-Wirkungsspektrum in vier Generationen eingeteilt.



6-Aminopenicillansäure



7-Aminocephalosporansäure

Abbildung 1: Grundstrukturen der Beta-laktame

2.2.1.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Das Grundgerüst der Penicilline bildet die fermentativ hergestellte 6-Aminopenicillansäure (6-APS) während sich die Cephalosporine aus der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) ableiten. Der Wirkungsmechanismus beider Substanzgruppen ist prinzipiell gleich und beruht auf der Inhibition des Endstadiums der Peptidoglykansynthese (Mureinsynthese) durch

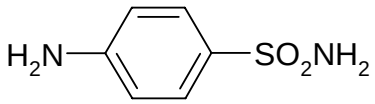
Angriff auf die zuständigen, bakteriellen Enzyme, die Peptidoglykansynthethasen, welche auch als „**p**enicillin **b**inding **p**roteins“ (PBPs) bezeichnet werden (CACCIATORE et al., 2004). Folge ist ein Defizit in der Peptidoglykansynthese und somit Lücken in der bakteriellen Zellwand, welche zum osmotisch bedingten Zelltod durch Lysis führen. Die Beta-laktam-Antibiotika wirken also bakterizid. Ihr Wirkungsspektrum umfasst hauptsächlich grampositive Bakterien, allerdings wird durch verschiedene Modifikationen an der Grundstruktur der Penicilline (beispielsweise Herstellung von Aminopenicillinen durch die Einführung von Aminoresten in die Benzylseitenkette) eine höhere Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien erreicht (GOOTZ, 1990). Auch bei Cephalosporinen kommt es zu strukturabhängigen Wirkungsänderungen. Während die Cephalosporine der ersten Generation vor allem gegenüber grampositiven Bakterien wirksam sind, weisen die Cephalosporine der zweiten, dritten und vierten Generation ein breiteres Wirkungsspektrum auf, welches sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien einschließt (GOOTZ, 1990).

Des Weiteren gibt es so genannte Beta-laktamase-Inhibitoren, wie Tazobactame, Sulbactame oder Clavulansäure, welche die Beta-laktam-Ring-spaltende Aktivität bakterieller Enzyme hemmen (WILLIAMS, 1999). Sie werden in der Veterinärmedizin vor allem in Form von Kombinationspräparaten mit Aminopenicillinen (z.B. Ampicillin oder Amoxicillin) eingesetzt (WILLIAMS, 1999; KROKER et al., 2002)

2.2.2 Sulfonamide und Trimethoprim

2.2.2.1 Allgemeines

Sulfonamide waren vor der Einführung des Penicillins die wichtigsten antimikrobiellen Wirkstoffe. Gerhard Domagk entdeckte 1935 die Wirksamkeit von Prontosil, einem Azofarbstoff, gegen eine experimentelle Streptokokkeninfektion mittels Versuchen an Tieren und Menschen (DOMAGK, 1935). Dabei ist das Sulfanilamid die mikrobiell aktive Substanz und bildet somit auch die strukturelle Basis für die Synthetisierung von Sulfonamiden. Trimethoprim wurde im Jahre 1957 erstmals hergestellt.



Sulfanilamid

Abbildung 2: Die strukturelle Basis der Sulfonamide: Sulfanilamid

2.2.2.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Sulfonamide sind Amide aromatischer Sulfonsäuren, genauer Derivate des p-Aminobenzolsulfonamids (Sulfanilamid). Es gibt Verbindungen, bei denen die Sulfonamidgruppe (N^1) substituiert ist (N^1-Derivate) und Verbindungen mit Substitution der aromatischen Aminogruppe (N^4-Derivate). Erstere zeichnen sich durch gesteigerte Wirkungsintensität und Verbesserung verschiedener anderer Eigenschaften aus, letztere durch den Verlust der antibakteriellen Aktivität und Verringerung der Resorption. Der Wirkungsmechanismus der Sulfonamide beruht auf der Synthesehemmung der bakteriellen Folsäure, einem wichtigen Baustein der bakteriellen DNA-, RNA- und Proteinsynthese. Es ist eine kompetitive Hemmung, welcher eine Substratkonkurrenz-Situation aufgrund einer Strukturähnlichkeit der Sulfonamide mit der p-Aminobenzoesäure zugrunde liegt (STAHLMANN und LOBE, 2005). Der Wirkungstyp der Sulfonamide ist somit bakteriostatisch. Ihr Wirkungsspektrum umfasst zahlreiche grampositive und gramnegative Keime sowie Protozoen, die während ihrer Wachstumsstadien ebenfalls angreifbar sind.

Trimethoprim ist ein Derivat des 2,4-Diaminopyrimidins. Es handelt sich hierbei um einen Antimetaboliten des Folsäurestoffwechsels. Seine Wirkung beruht auf einer Strukturähnlichkeit mit der Dihydrofolsäure, wodurch es vom Enzym Dihydrofolsäurereduktase an deren Stelle angegriffen wird. Somit wird die bakterielle Nukleinsäuresynthese gehemmt. Die Wirkung des Trimethoprims ist also bakteriostatisch, sein Wirkungsspektrum mit dem der Sulfonamide vergleichbar. Trimethoprim wird in der Veterinärmedizin häufig in Kombination mit Sulfonamiden angewendet, da deren Wirkung so zu potenzieren ist. Allerdings kommt es beim Rind auch als Monopräparat zum Einsatz, wobei es hier vor allem intramammär verabreicht wird und deshalb milchhygienisch bedeutsam ist (KROKER et al., 2002).

2.2.3 Tetracycline

2.2.3.1 Allgemeines

Im Jahre 1948 wurden Chlortetracyclin und Oxytetracyclin als erste Substanzen der Tetracyclin-Gruppe aus *Streptomyces aureofaciens* und *Streptomyces rimosus* gewonnen. Später wurden weitere Substanzen in Form natürlicher oder semi-synthetischer Moleküle beschrieben, so dass die Tetracycline nach ihrer zeitlichen Entdeckung in drei Generationen einteilbar sind (CHOPRA und ROBERTS, 2001).

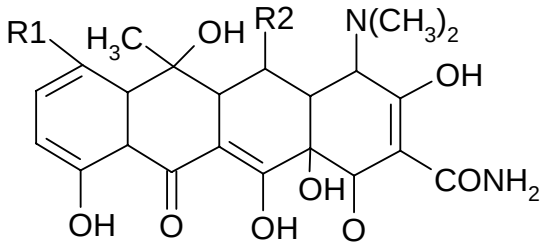


Abbildung 3: Struktur der Tetracycline

2.2.3.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Tetracycline bestehen aus vier linear kondensierten Sechserringen, an die verschiedene funktionelle Gruppen angehängt sind. Sie binden an das bakterielle 70S-Ribosom, wodurch die Bindung der Aminoacryl-tRNA an die Akzeptorstelle unterbunden und die Proteinbiosynthese gehemmt wird. Somit wirken Tetracycline als Breitspektrumantibiotika bakteriostatisch gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie gegen Chlamydien- und Rickettsieninfektionen und große Virusarten. Zusätzlich besitzen sie eine starke Affinität zu polyvalenten Kationen unter Bildung von Chelatverbindungen, was sicherlich zu ihrer Wirkung beiträgt (STAHLMANN und LOBE, 2005). Obwohl sie eine relativ schwache Affinität zu eukaryontischen 80S-Ribosomen besitzen, wurde aufgrund der Anwesenheit von 70S-Ribosomen in Mitochondrien eine Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese bei Eukaryonten beobachtet, was eine Erweiterung des Wirkungsspektrums auf verschiedene Protozoenarten zur Folge hat (CHOPRA und ROBERTS, 2001).

2.2.4 Aminoglykoside und Makrolide

2.2.4.1 Allgemeines

Selman Waksman isolierte 1944 das erste Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin aus *Streptomyces griseus* (OTTEN et al., 1975) Seitdem wurden etliche Aminoglykoside aus diversen Streptomyces- und Micromonospora-Arten gewonnen, wobei die verschärfte bakterielle Resistenzlage ihren Einsatz in der Medizin immer mehr beschränkt (GOOTZ, 1990; AGNELLI et al., 2004). Dennoch finden einzelne Aminoglykoside, wie z.B. das Gentamicin, in der Veterinärmedizin weiterhin breite Anwendung (KROKER et al., 2002).

Erythromycin A wurde als erster Vertreter der Makrolid-Antibiotika 1952 aus *Streptomyces erythreus* isoliert. Mittlerweile werden Makrolide ausgehend von dieser Grundstruktur halb- oder vollsynthetisch hergestellt. Zusätzlich ist Ester- und Salzbildung möglich (KROKER et al., 2002). In der Veterinärmedizin werden Makrolide wie Tylosin oder Spiramycin beispielsweise zur Therapie von Atemwegserkrankungen angewendet (SITU und ELLIOTT, 2005).

2.2.4.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Die chemische Struktur der Aminoglykoside basiert auf Aminozuckern, die über glykosidische Bindungen mit Hydroxylgruppen von Amino- oder Guanin-substituierten Cyclohexanol verknüpft sind. Sie entfalten ihre primär bakterizide Wirkung indem sie selektiv an das prokaryontische 30S-Ribosom binden und so den Ablauf der Proteinbiosynthese beeinflussen ohne sie zu unterbinden. Über Interaktionen mit Translokationsvorgängen kommt es zu Fehlsteuerungen, was die Bildung von „nonsense-Proteinen“ mit bakterizider Wirkung zur Folge hat. Aminoglykoside wirken gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Eine Kombination von Streptomycin mit Benzylpenicillin bietet sich zwar an, da durch die Schädigung der Zellwand durch das Penicillin dem Aminoglykosid der Eintritt in die Zelle erleichtert wird, es sollte jedoch aufgrund der ungünstigen Resistenzlage auf den Einsatz solcher Präparate verzichtet werden (KROKER et al., 2002).

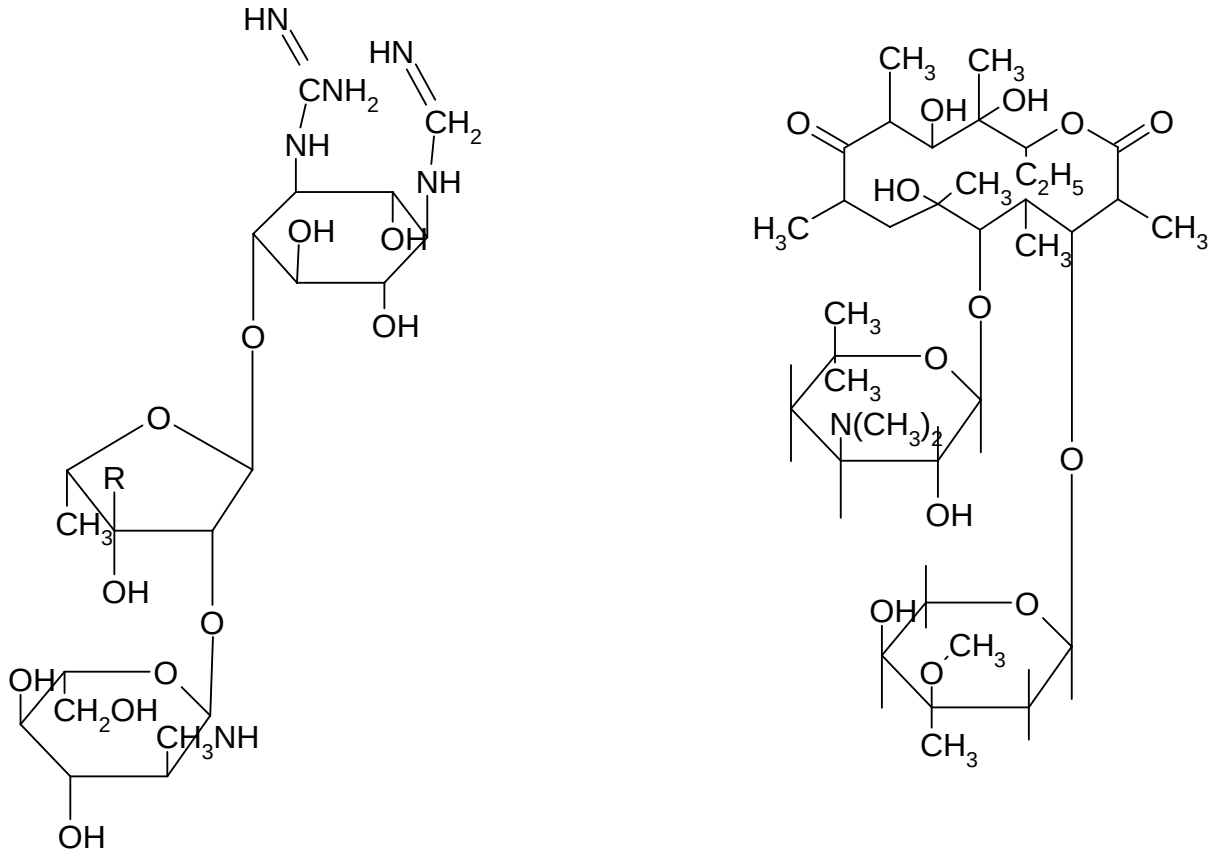


Abbildung 4: Grundstruktur des Aminoglykosids (Dihydro-) Streptomycin (links); Struktur des Makrolids Erythromycin (rechts)

Makrolide bestehen aus einem 14- bis 16-gliedrigen Laktonring, der an ein bis drei Stellen über glykosidische Bindungen mit Amino- oder Neutralzuckern substituiert ist. Sowohl die Zucker als auch die Ketogruppe des Laktonrings sind essentiell für ihre pharmakologische Wirkung. Angriffspunkt der Makrolide ist die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms, an welche sie reversibel binden. So hemmen sie Transpeptidations- und Translokationsprozesse der Proteinbiosynthese, was zur vorzeitigen Abtrennung unvollständiger Peptidketten und somit unweigerlich zum Zelltod führt (RETSEMA und FU, 2001). Das Wirkungsspektrum der Makrolid-Antibiotika umfasst grampositive und einige gramnegative Bakterien wie *Haemophilus* und Anaerobier, sowie zellwandlose Bakterien wie Mykoplasmen (STAHLMANN und LOBE, 2005).

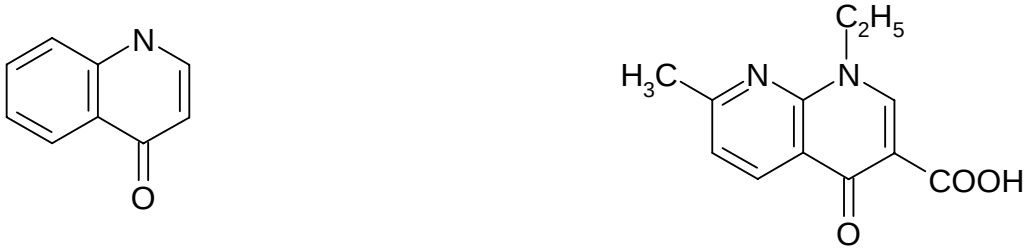
2.2.5 Chinolone

2.2.5.1 Allgemeines

Die Entwicklung der Chinolone beruht auf der Entdeckung eines antimikrobiell wirksamen Bestandteiles von Chloroquin, einem Medikament gegen Malaria. Dieser Bestandteil wurde 1962 isoliert, modifiziert und als Nalidixinsäure, dem ersten, kommerziell erhältlichen Chinolon, in den Handel gebracht (LESHER et al., 1962). Kurz nach ihrer Einführung und Verbreitung zu Therapiezwecken erkannte man, dass eine große Anzahl von Mikroorganismen schnell Resistenzen gegen die Substanz entwickelten, weshalb durch diverse Modifikationen an der Ausgangssubstanz versucht wurde, die Resistenzentwicklung zu minimieren und gleichzeitig eine Wirkungsverbesserung zu erzielen (APPELBAUM und HUNTER, 2000).

2.2.5.2 Chemische Struktur, Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Die Grundstruktur der Chinolone bildet entweder ein 4-Chinolon oder ein strukturähnliches Naphtyridin-, Cinnolon- oder Pyridopyrimidingrundgerüst, welches an Position 6 eine Carboxylgruppe trägt. Chinolone der ersten Generation gehen strukturell auf die Nalidixinsäure zurück, sind also Naphtyridinderivate. Eine Fluorsubstitution an Position vier oder sechs der Chinoloncarbonsäure zeichnet Chinolone der zweiten Generation aus, die Fluorchinolone.



Chinolon Nalidixinsäure

Abbildung 5: Grundstruktur der Chinolone (links); Struktur der Nalidixinsäure (rechts)

Chinolone sind Gyrasehemmer. Das bakterielle Enzym Gyrase bewirkt durch Aufspaltung der Zucker-Phosphat-Bindung beider DNA-Stränge und ihrer Wiederverknüpfung eine ATP-abhängige Überspiralisierung der DNA-Doppelhelix. Dadurch wird die DNA in eine räumlich kompaktere Form gebracht und der geregelte Ablauf wichtiger DNA-Funktionen gewährleistet. Fluorchinolone binden an die bakterielle Gyrase und Hemmen ihre Funktion, wodurch diese Abläufe gestört werden. Sie wirken so einerseits bakteriostatisch, besitzen jedoch ebenfalls einen ausgeprägten bakteriziden Effekt, dessen genaue Mechanismen bisher noch weitgehend ungeklärt sind (KROKER et al., 2002). Das Wirkungsspektrum der Chinolone der ersten Generation erstreckt sich hauptsächlich auf einige gramnegative *Enterobakteriaceae*, das der zweiten Generation ist dagegen sehr breit und umfasst beide Bakteriengruppen, gramnegative sowie grampositive Bakterien. Eine Wirksamkeit besteht zudem gegen Chlamydien, Mykobakterien und Mykoplasmen (APPELBAUM und HUNTER, 2000).

2.3 Nachweis von Antiinfektiva in Kuhmilch

Nicht nur aufgrund der offensichtlichen Gefährdung für den Verbraucher (siehe 2.1.2), sondern auch aufgrund der bestehenden Rechtslage (siehe 2.1.3) steigt sowohl für Landwirte als auch für Molkereien die Verpflichtung, die Hemmstofffreiheit der von ihnen produzierten bzw. ver- und bearbeiteten Milch zu garantieren. Wegen der zum Teil erheblichen Unterschiede bezüglich der Struktur der einzelnen Substanzen, gibt es kein einzelnes Nachweisverfahren, mit dem alle für das Lebensmittel Milch festgelegten Höchstmengen in ausreichender Empfindlichkeit erfasst werden (SUHREN, 2002). Deshalb empfehlen HEESCHEN und SUHREN (1996) ein von ihnen entwickeltes „integriertes Nachweissystem“, bei welchem durch die gezielte Kombination verschiedener Nachweisverfahren die Erfassung aller Hemmstoffe in der Milch gewährleistet werden soll. Hierbei kommen „klassische“ mikrobiologische Hemmstofftests meist in erster Instanz zum Einsatz, ergänzt von Bestätigungstests, wie beispielsweise Enzymimmuntests (EIA) oder Schnelltestsystemen, und schließlich physikalisch-chemischen Identifizierungs- und Quantifizierungsmethoden (z.B. HPLC, GC, LC-MS).

2.3.1 Mikrobiologische Hemmstofftests

2.3.1.1 Allgemeines

Mikrobiologische Hemmstofftests sind die ältesten Methoden zum Nachweis von Antiinfektiva in Kuhmilch und basieren auf der Darstellung einer Wachstumshemmung verschiedener sensibler Bakterienstämme unter Antibiotikaeinfluss. Der erste mikrobiologische Hemmstofftest wurde bereits 1952 entwickelt. Der Testkeim war damals *Bacillus (B.) subtilis*. Üblicherweise wird in der Routineuntersuchung von Milch auf Antiinfektiva *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* eingesetzt, es gibt jedoch auch verschiedene Testsysteme, bei denen *B. subtilis, B. cereus, Micrococcus luteus, Escherichia (E.) coli, B. megaterium* oder *Streptococcus thermophilus* als Testkeime fungieren (MITCHELL et al., 1998).

In Abwesenheit von Antiinfektiva ist das Wachstum der Bakterienstämme visuell je nach Testformat entweder durch die Trübung des verwendeten Nährmediums oder durch eine Farbänderung sichtbar. In Anwesenheit eines Antiinfektivums oder jedes anderen Hemmstoffes, bleibt das Wachstum der Mikroorganismen aus, was in Form einer Hemmzone oder durch das Ausbleiben der Farbänderung angezeigt wird. Solche Testsysteme sind generell zuverlässig und kostengünstig, allerdings beträgt die Reaktionszeit zwischen 2,5 und 18 Stunden. Außerdem sind sie unspezifisch und durch die Verwendung von *B. stearothermophilus* als Indikatorkeim meist auf den Nachweis von Beta-laktam-Antibiotika und Sulfonamiden beschränkt (HEESCHEN und SUHREN, 1996; MITCHELL et al., 1998; NEAVES, 1999). Durch Zugabe des Enzyms Penicillinase oder para-Aminobenzoesäure (PABA) ist eine zusätzliche Klassifizierung der Rückstände möglich (HEESCHEN und SUHREN, 1996; MITCHELL et al., 1998; AIM, 2002).

Die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG beschreibt zwei Methoden zur Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe. Methode L 01.00-6 basiert auf dem Nachweis von Hemmstoffen mittels Blättchentest, bei dem nach Auflegen eines mit Untersuchungsmaterial getränkten Zelluloseblättchens auf einen mit *B. stearothermophilus* beimpften Nähragar und anschließender Inkubation die Ausbildung eines Hemmhofes beurteilt wird. Methode L 01.01-5 beschreibt den Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT), der bei der Untersuchung von Sammelmilch im Rahmen der Milch-Güte VO alternativ zum Blättchentest eingesetzt wird. Dieser Test verwendet ebenfalls *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim und basiert auf der Reduktion des Indikators Brillantschwarz. Sind

Hemmstoffe anwesend, dann bleibt eine Blaufärbung bestehen. Findet ein Farbumschlag nach gelb statt, so ist die Milch negativ. Zusätzlich zum Probenmaterial werden eine Positivkontrolle (4 µg/kg Benzylpenicillin) und eine Negativkontrolle mit angesetzt, wobei alle Reaktionssysteme, die mindestens die Farbintensität der Positivkontrolle aufweisen, als positiv zu bewerten sind. Alternativ beschreibt Methode L 01.00-11 („Suchverfahren“) eine Auswertemethode, bei der alle Reaktionssysteme als positiv bzw. verdächtig zu bewerten sind, die einen Farbton aufweisen, welcher eindeutig vom Farbton der Negativkontrolle unterscheidbar ist. Neben Systemen mit Redoxindikator gibt es auch Systeme mit pH-Indikator (Delvotest SP). Die Anwesenheit von Hemmstoffen wird auch hier durch verschiedenartige Färbung des Testmediums dargestellt.

2.3.1.2 Modifizierter Agardiffusionstest mit *E. coli*

Da das Nachweisspektrum kommerziell vertriebener Testsysteme hauptsächlich Beta-laktam-Antibiotika und Sulfonamide umfasst, gab es zahlreiche Versuche zur Entwicklung mikrobiologischer Testsysteme, mit denen durch Einsatz verschiedener Testkeime der Nachweis anderer Antiinfektiva in Milch möglich ist. Hierbei hat sich unter anderem *E. coli* zum Nachweis von Chinolonen in Milch als geeignet erwiesen (OKERMAN et al., 2000; TSAI und KONDO, 2001). Dies führte zur Entwicklung eines Agardiffusionstests mit dem Indikatorkeim *E. coli* (ATCC 11303) und dem Farbstoff Neutralrot als pH-Indikator (SUHREN et al., 1996). Beurteilt wurde die durch eine Veränderung des pH-Wertes ausgelöste Farbänderung des Nährmediums (SUHREN, 1996; SUHREN et al., 1996). Durch GÄRTNER et al. (2004) wurde dieses Testprinzip in aktuellen Versuchen durch Veränderung verschiedener Testparameter modifiziert.

2.3.2 Schnelltestsysteme

2.3.2.1 Allgemeines

Als einer der größten Nachteile mikrobiologischer Hemmstofftestsysteme gilt die lange Testdauer (MITCHELL et al., 1998; NEAVES, 1999). Für Molkereien besteht also ein großes Interesse an alternativen Testsystemen, die so schnell ablaufen, dass im Falle eines positiven Ergebnisses noch in den Produktionsverlauf eingegriffen werden kann. Eine Testdurchführung auf Tankwagenebene mit Untersuchung auf möglichst viele der in Frage kommenden Wirkstoffe, am besten durch den Tankwagenfahrer, ist also anzustreben (SUHREN und REICHMUTH, 1998). Auch eine Untersuchung von Sammelmilchproben oder Einzelgemelken durch den Landwirt oder Tierarzt wäre ein immenser Vorteil und ein mögliches Einsatzgebiet schneller, verlässlicher und einfach durchzuführender Schnelltestsysteme (MUSSER und ANDERSON, 1999).

2.3.2.2 Charm II

Der Charm II Test wurde nach Stanley E. Charm benannt, der 1979 den so genannten Charm-Test entwickelte. Dieser liegt dem heutigen, modifizierten Format zugrunde und wird unter dem Namen Charm II seit 1987 kommerziell von der Firma Charm Sciences Inc. (früher Penicillin Assays Inc.) vertrieben (ZOEMER et al., 1993). Es handelt sich hierbei (je nach Nachweis) um einen radioaktiv markierten mikrobiellen Rezeptorbindungstest bzw. Antikörperbindungstest. Das Testprinzip beruht auf einer Konkurrenz zwischen den mit radioaktivem ^{14}C bzw. ^{3}H markierten Antibiotika/ Sulfonamiden („Tracer“) und den in der Milch befindlichen Antiinfektiva-Rückständen um spezifische Rezeptorbindungsstellen. Messgröße ist die Menge des gebundenen, radioaktiv markierten Hemmstoffs, dessen Menge mittels Szintillationszähler als Impulse pro Minute („**c**ounts **p**er **m**inute“ = CPM) gemessen wird. Da bei antibiotika-freier Milch nur der radioaktive Tracer an die Rezeptoren bindet, weisen solche Proben die höchsten Impulszahlen auf, während bei Vorliegen von spezifischen Chemotherapeutika in der Milch die gemessenen Impulszahlen entsprechend abnehmen. Zur Ermittlung des endgültigen Ergebnisses („positive“ oder „not found“) werden schließlich die gemessenen CPM mit einem durch vorherige Kalibrierungsmessungen bestimmten Kontrollpunkt verglichen.

Da die Bindungsreaktion zwischen der Rezeptorstelle und der funktionellen Gruppe des Antibiotikums/Sulfonamids stattfindet, werden alle Substanzen einer Gruppe erfasst, was eine hohe Sensitivität, aber eine geringe Spezifität des Testsystems bedingt (CHARM und CHI, 1988; CARLSSON und BJÖRCK, 1991; MOATS et al., 1995; JUNG, 1996). Aufgrund dessen handelt es sich beim Charm II hauptsächlich um einen „Screening-Test“, mit dem sich zwar die einzelnen Antiinfektiva-Klassen differenzieren lassen, der jedoch nicht in der Lage ist, den enthaltenen Wirkstoff qualitativ oder quantitativ zu bestimmen. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wird die Anfertigung von Standardkurven mittels bekannter Substanzkonzentrationen vor Beginn der Messungen notwendig. So ist die Ermittlung der Menge des detektierten Hemmstoffes möglich, vorausgesetzt seine Identität ist bekannt (CHARM SCIENCES INC., o. J. a; CHARM SCIENCES INC o. J. b).

Für den Charm II sind Nachweise für Beta-laktame, Sulfonamide, Tetracycline, Aminoglykoside und Makrolide kommerziell erhältlich.

2.3.2.3 Charm ROSA

Das Charm ROSA („**r**apid **o**ne **s**tep **a**ssay“) Testsystem stellt eine Weiterentwicklung des Charm MRL Tests für Beta-laktam-Antibiotika dar, welches seit 1998 kommerziell erhältlich ist. Es zeichnet sich durch die Erweiterung der Nachweismöglichkeiten auf Nicht-Beta-laktame und die Weiterentwicklung des Equipments, vor allem die Verbesserung des Readers, aus. Dabei handelt es sich um einen indirekt kompetitiven Rezeptorbindungstest, der in Form von Streifen erhältlich („Strip-ELISA“) und in einem einzigen Arbeitsschritt ausführbar ist („Ein-Schritt-Test“). Der Test wird, wie auch das Charm II Testsystem, von der Firma Charm Sciences Inc. hergestellt und in Europa von MCS Diagnostics vertrieben. Es sind Nachweise für Beta-laktam-Antibiotika, Sulfonamide, Tetracycline, Enrofloxacin und Aflatoxin erhältlich.

Nach Einbringen des Probenmaterials in die Vertiefung der Teststreifen erfolgt die Inkubation im mitgelieferten Inkubator. Währendessen wandert die Flüssigkeit, angetrieben durch kapillare Migrationskräfte, über ein Feld mit reversibel immobilisiertem Rezeptor-Goldkonjugat, welches mit der Flüssigkeit wandert und an eventuell vorhandene Antiinfektiva bindet. Die noch freien, mitgewanderten Rezeptoren werden an einer Linie mit irreversibel an

die Testmembran gebundenem Antiinfektivum gebunden. Enthielt die Probe Antiinfektiva, so ist der Großteil der farblich markierten Rezeptoren schon belegt und kann nicht an die Testlinie binden - die Testlinie ist nur schwach ausgeprägt. Am Ende des Teststreifens wandert die Flüssigkeit noch über eine Kontrolllinie, die immer ausgebildet werden muss. Die Auswertung erfolgt über einen Vergleich dieser beiden Linien, wobei die Ausprägung der Testlinie umgekehrt proportional zum Hemmstoffgehalt der Probe ist (LEGG et al., 2003). Der Charm ROSA Test ist sowohl visuell als auch instrumentell auswertbar, wobei die instrumentelle Auswertung jedoch empfohlen wird (REYBROECK und OOGHE, 2002).

2.3.2.4 Parallux

Das Parallux-System ist ein Schnelltestsystem, welches bis Februar 2005 von der amerikanischen Firma IDEXX kommerziell vertrieben wurde. Danach wurde die Produktionslinie von der südkoreanischen Firma MEDEXX übernommen. Das System basiert auf der so genannten SPFIA-Technologie („**s**olid-**p**hase **f**luorescence **i**mmuno**a**ssay“) und es stehen Nachweise für Beta-laktam-Antibiotika (Cloxacillin, Cephapirin, Penicillin G und Ceftiofur), Sulfonamide (Sulfamethazin, Sulfadimethoxin und Sulfathiazol) und Tetracyclin zur Verfügung.

Parallux ist ein System, welches die für die Testdurchführung notwendigen Instrumente in einem Gerät vereint und die meisten Arbeitsschritte automatisch ausführt. Das Ergebnis wird von einem ebenfalls in das System integrierten Drucker ausgedruckt. Das Probenmaterial wird in die Vertiefungen des Reagenz-Tabletts eingegeben, in welchem sich die mit einem Fluoreszenz-Konjugat markierten Antikörper befinden. Hier erfolgt die erste Inkubation, wobei die Antikörper an eventuelle Antiinfektiva in der Milch binden. Danach wird die Milch in die Glaskapillaren der Testkartusche aufgezogen, welche mit entsprechenden Antiinfektiva beschichtet sind. Verbleibende freie Antikörper können nun während einer zwei-minütigen Inkubationsphase an diese Antiinfektiva in den Glaskapillaren binden. Nach einem automatisch durchgeführten Waschschritt, wird die Testkartusche in ein Lesegerät eingelegt, in welchem der gebundene Fluoreszenzfarbstoff mittels Laserstrahlen angeregt wird. Die Intensität der Fluoreszenz wird ermittelt und zur Ergebnisberechnung verwendet. Je höher die Fluoreszenz desto weniger Hemmstoff befindet sich in der Probe.

Das Ergebnis wird als „Ratio“ dargestellt, einer Differenz zwischen dem „Hemmwert“ der Probe (= „sample inhibition value“) und einem nicht näher definierten „cut-off-Hemmwert“ (= „cut-off inhibition value“). Dieser Wert ist Chargen-abhängig und wird in dem auf der Testkartuschenverpackung abgedruckten Barcode gespeichert, welcher vor jeder Messung in das Gerät eingelesen werden muss. Jede Glaskapillare repräsentiert einen unabhängigen Nachweis. Da jede Testkartusche vier verschieden miteinander kombinierbare Nachweise enthält (IDEXX, 2002), können so in einem Testdurchgang vier unterschiedliche Tests durchgeführt werden, was ein großer Vorteil gegenüber anderen immunologischen Testverfahren darstellt (OKERMAN et al., 2003).

2.3.2.5 Funktionsprinzip des Biosensor-Prototyp („Immunomat“)

Definitionsgemäß sind Biosensoren Kombinationssysteme aus einer biologischen Komponente - beispielsweise Antikörper, Lektine, DNS oder Zellen - und einer physikalischen Komponente, dem so genannten „Transducer“. Dieser wandelt den biochemischen oder biophysikalischen Vorgang (z.B. Antigen-Antikörper-Bindung) in ein elektrisches Signal um, welches verstärkt und zur Auswertung an eine elektronische Messeinheit weitergeleitet wird (CASS, 1990).

Im Rahmen eines universitären Kooperationsprojekts zwischen dem Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München und dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde von 2000 bis 2003 ein Biosensor-Prototyp („Immunomat“) entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes „PASA-System“ (= **p**arallel **a**ffinity **s**ensor **a**rray), einem immunchemischen Biosensor, mit dem der parallele Nachweis einer Vielzahl von Antiinfektiva möglich ist (EIBERLE, 2004; KNECHT et al., 2004).

Das Testprinzip basiert auf einem indirekten kompetitiven Enzymimmuntest (EIA), bei welchem das zugeführte Antigen (hier das Antiinfektivum in der Milchprobe) und das an der Festphase immobilisierte Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Die Festphase ist hier ein Einweg-„Biochip“, auf dem die einzelnen Antigene als Antigen-Protein-Konjugate (Festphasenantigene) in Form kleiner „Spots“ mit einem Nanopipetiersystem (Piezospotter) aufgebracht werden. Diese Spots werden in horizontal

verlaufenden Parallelreihen angeordnet, wobei jede Reihe aus sieben Spot-Replikaten besteht und einen eigenen Nachweis darstellt. Alternierend zu diesen Reihen werden Referenzreihen aufgebracht. Die Biochips werden in der lichtundurchlässigen Flusszelle des PASA-Systems positioniert. Wird nun eine Milchprobe und spezifische Antikörper hinzugefügt, so läuft bei Anwesenheit des Antigens in der Milch eine Antigen-Antikörper-Reaktion ab, bei welcher umso weniger Antikörper an den Spots des Biochips binden, je höher die Konzentration des entsprechenden Antigens in der Probe ist. Durch Zugabe eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers werden die gebundenen Antikörper nachgewiesen. Das Messsignal wird über die Zugabe eines Chemielumineszenz-Substrates erzeugt, wobei durch eine Peroxidase-katalysierte, exotherme Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Luminol Licht entsteht. Die von den verschiedenen Spots abgegebene Lichtintensität wird mittels CCD-Kamera detektiert und verhält sich umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in der Milch. Das Bild der CCD-Kamera wird nach Abschluss der Messung automatisch auf einen integrierten Steuerungs-Laptop transferiert, wo es über verschiedene Anwendungsprogramme bearbeitbar ist.

Derzeit stehen für den Immunomaten funktionsfähige Nachweise für verschiedene Beta-laktame, Sulfonamide, Aminoglykoside und Makrolide zur Verfügung.

2.3.2.6 Weitere kommerziell erhältliche Schnelltestsysteme und Biosensoren

Neben den bereits erwähnten Testsystemen ist eine Vielzahl weiterer Schnelltestsysteme kommerziell erhältlich. Hierunter finden vor allem der indirekt kompetitive Rezeptorbindungstest β-s.t.a.r., die indirekt kompetitiven Enzym-Rezeptortests Delvo-X-Press und Snap-Test und der enzymatische Penzym-Test weite Verbreitung (MITCHELL et al., 1998). Alle Tests verwenden spezifische Bindungsproteine, die von in der Milch enthaltenen Antiinfektiva entweder irreversibel oder in Konkurrenz mit einem an eine Festphase gebundenen entsprechenden Analyten gebunden werden. Über Hemmung der Enzymaktivität oder Messung der gebundenen Proteinmenge entsteht ein Messsignal, welches visuell oder instrumentell auswertbar ist. Den Vorteilen dieser Tests, wie ihre einfache Handhabung, kurze Analysezeit und Gruppenspezifität, stehen etliche Nachteile, wie Beeinflussbarkeit der Ergebnisse durch veränderte Milchbeschaffenheit, teilweise unzureichende Testsensitivität und apparativer Aufwand gegenüber (GANGWER et al., 1994; KROLL, 2000).

Biosensoren haben in den letzten Jahren vermehrt Einzug in die Rückstandsanalytik gehalten und sind bereits in verschiedenen Formaten kommerziell erhältlich (BAIRD und MYSZKA, 2001; MELLO und KUBOTA, 2002; PATEL, 2002; RAND et al., 2002). Unter den Biosensoren zum Nachweis von Antiinfektiva in Milch sind insbesondere optische Biosensoren nach dem SPR-Prinzip („**s**urface **p**lasmon **r**esonance", d.h. Oberflächenplasmon-Resonanz) weit verbreitet. Dieses beruht auf einer kollektiven Schwingungsanregung freier Elektronen auf sehr dünnen Edelmetallfilmen. Die Elektronen werden durch die Photonen eines einfallenden Laserstrahls in resonante Schwingung versetzt, welche durch die Eigenschaften der mit dem spezifischen Reaktionspartner (Antikörper oder Antigen) versehenen Sensorschicht bestimmt wird. Durch Veränderungen in den Charakteristika der Grenzschicht kommt es zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels, welche präzise messbar ist. Dadurch können schon kleinste Änderungen in der Konzentration des Analyten bestimmt werden (GUSTAVSSON et al., 2002a; GUSTAVSSON et al., 2002b; GUSTAVSSON, 2003). In den letzten Jahren wurden für dieses System zahlreiche Nachweise für verschiedene Antiinfektiva in Milch entwickelt (STERNESJÖ et al., 1995; MELLGREN und STERNESJÖ, 1998; GAUDIN et al., 2001; HAASNOOT und VERHEIJEN, 2001; HAASNOOT et al., 2002). Zudem ist es mit dieser Technologie möglich, Messungen von Reaktionsabläufen in Echtzeit vorzunehmen, was ein Vorteil dieses Systems ist (HOMOLA et al., 1999). Zudem ist die Oberfläche der verwendeten Biochips regenerierbar, was eine mehrfache Verwendung möglich macht. Ein Nachteil dieses Systems sind die hohen Kosten, die eine Anschaffung auf größere Labors mit ausreichendem Probendurchlauf beschränken.

2.3.3 Physikalisch-chemische und enzymimmunologische Nachweisverfahren

Zu den physikalisch-chemischen Nachweisverfahren zählen colorimetrische, spektrophotometrische, elektrophoretische und chromatographische Verfahren, wobei den chromatographischen Verfahren (Dünnschicht-/Gas-/Hochdruckflüssigkeitschromatographie) die größte Bedeutung zukommt. Diese Methoden sind aufgrund ihrer Fähigkeit, auch sehr geringe Rückstandsmengen zu spezifizieren und zu quantifizierten als Bestätigungstest einsetzbar. Allerdings sind sie arbeitsintensiv und kostspielig, was sie für den Einsatz in der Routinediagnostik unbrauchbar macht (MITCHELL et al., 1998).

Enzymimmunologische Nachweisverfahren (EIA) basieren auf der Fähigkeit von Antikörpern, spezifische molekulare Strukturen (=Antigene) zu erkennen und zu binden (MÄRTLBAUER, 1995). In erster Linie eignen sich enzymimmunologische Verfahren als Screening-Verfahren. Gegenüber den mikrobiologischen Hemmstofftests haben sie den Vorteil, dass sie sowohl eine Quantifizierung als auch eine Identifizierung der Substanzen ermöglichen. Eine Aufstellung der Spezifität verschiedener EIAs zum Nachweis von Antiinfektiva findet sich in MÄRTLBAUER et al. (1994).

2.4 Nachweis von Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen-, und Kamelmilch

2.4.1 Bedeutung von Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch

Nicht nur aus ernährungsphysiologischen und diätetischen, sondern auch aus wirtschaftlichen Gründen hat die Erzeugung von Schaf- und Ziegenmilch in Europa mittlerweile große Bedeutung. Ursachen für die positive Entwicklung sind unter anderem das Quotensystem bei Kuhmilch, die Möglichkeit der Nutzung schwer zu bewirtschaftender Flächen, ein zunehmender Trend zu naturbelassenen Lebensmitteln sowie der hohe Genusswert von Schaf- und Ziegenkäse (BECKER, 1988; MARK und SCHÖNE, 2000; SCHULZE, 2002).

In den (semi-) ariden Gebieten Afrikas und Asiens ist Kamelmilch schon lange ein wichtiges Grundnahrungsmittel (KAPPELER, 1998; WERNERY und WERNERY, 2001; FARAH und FISCHER, 2004). Die Milch wird roh oder zu Joghurt bzw. Käse fermentiert verzehrt. Zudem ist sie als Naturheilmittel gegen verschiedenste Krankheitsbilder oder als Alternative für Kuhmilch-Allergiker einsetzbar. Da sie der Muttermilch sehr ähnlich ist, ist sie ein guter Milchersatz für Säuglinge (RESTANI et al., 1999; WERNERY, 2003; BICKNÄSE und GUHLMANN, 2005). Auch in Europa ist Kamelmilch mittlerweile erhältlich. In Deutschland wurden in den letzten Jahren Kamelfarmen eröffnet, die neben Kamelfleisch auch Milch und Produkte aus Kamelmilch verkaufen.

Die Zusammensetzung von Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch unterscheidet sich in vielen Punkten von der von Kuhmilch. Dabei unterscheiden sie sich nicht nur in ihren Hauptbestandteilen, wie beispielsweise Wasser, Protein, Fett, Laktose und Mineralstoffe, sondern auch in ihren minoren Bestandteilen wie Spurenelementen und Vitaminen (WERNERY, 2003; CASALTA et al., 2004; FARAH und FISCHER, 2004; BICKNÄSE und

GUHLMANN, 2005). Eine Aufstellung der wichtigsten Unterschiede bezüglich der Hauptbestandteile findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Hauptbestandteile von Milch verschiedener Tierarten (nach FARAH und FISCHER, 2004)

Tierart	Wasser (%)	Fett (%)	Laktose (%)	Protein (%)	Asche (%)
Kuh	86-88	3,7-4,4	4,8-4,9	3,2-3,8	0,7-0,8
Schaf	79-82	6,9-8,6	4,3-4,7	5,6-6,7	0,9-1,0
Ziege	87-88	4,0-4,5	3,6-4,2	2,9-3,7	0,8-0,9
Kamel	86-88	2,9-5,4	3,3-5,8	3,0-3,9	0,6-1,0

2.4.2 Anwendbarkeit kommerzieller Nachweisverfahren auf Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch

Aufgrund der bereits erwähnten Bedeutungszunahme von Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch für europäische Konsumenten, ist eine Überprüfung der Lebensmittelsicherheit für den Verbraucher sowie der technologischen Qualität hinsichtlich der Verarbeitung zu Milchprodukten unerlässlich. Routinemäßig eingesetzte mikrobiologische Hemmstofftests (verwendeter Testkeim: *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) sind jedoch aufgrund ihrer erhöhten Neigung zu falsch-positiven Ergebnissen nur bedingt für den Einsatz von Schaf-, Ziegen- und Kamelmilch geeignet (SCHULZE, 2002; ALTHAUS et al., 2003; MOLINA, M. P. et al., 2003a; ZAADHOF et al., 2004; STRASSER et al., 2005; ZAADHOF et al., 2005). Dies wird vor allem auf die vermehrte Anwesenheit originärer Hemmstoffe (z.B. Laktoferrin, Lysozym), aber auch auf den erhöhten Gehalt an kurzkettigen, freien Fettsäuren in Schaf- und Ziegenmilch zurückgeführt.

Die Defizite mikrobiologischer Testsysteme machen den Einsatz alternativer Tests für den Nachweis von Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen oder Kamelmilch zunehmend interessanter (MOLINA, A. et al., 2003; MOLINA, M. P. et al., 2003b). Dennoch wurden sie erst wenig hinsichtlich ihrer Eignung für diese Milcharten überprüft. Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Schafmilch werden kommerzielle Schnelltests (Penzymtest, SNAP Beta-laktam Test, Charm MRL Test, β s.t.a.r.) zum Nachweis von Beta-laktamen nur als bedingt geeignet beschrieben, da sie wie schon die mikrobiologischen Hemmstofftests zu falsch-

positiven Ergebnissen neigen (ALTHAUS et al., 2001; SCHULZE, 2002). Auch die gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmengen waren nicht immer erfassbar. Hinsichtlich der Untersuchung von Ziegenmilch wird von ähnlichen Ergebnissen berichtet. Untersuchungen von Ziegenmilch mittels Charm II Beta-laktam Test ergaben jedoch eine sehr gute Sensitivität und Spezifität, so dass er zur Untersuchung dieser Milch als Alternativsystem empfohlen wird (CONTRERAS et al., 1997; ZENG et al., 1998; BARBOSA et al., 2004). Über die Eignung dieser Testsysteme für Kamelmilch wurde bisher nichts publiziert.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

1,4-Dithioerythritol	Sigma Chemie GmbH, D-8255
Borax, Decahydrat	Sigma Chemie GmbH, B-9876
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, 1.05104
Kaliumchlorid min 99,0 %	Sigma Chemie GmbH, P-4504
Kaliumhydrogenphosphat	Riedel de Haen AG, 30407
L (+) Milchsäurelösung 88-92 %	Riedel de Haen AG, S 301002
Methanol	Fluka Chemika GmbH (Schweiz), G 5543
Natriumchlorid	Riedel de Haen AG, 31434
Natriumhydrogencarbonat	Riedel de Haen AG, 31437
Natronlauge (1 mol/l)	Carl Roth GmbH & Co, K 021.1
Penicillinase Konzentrat	Difco Laboratories, 234610
Salzsäure (5 mol/l)	Merck KGaA, 1.09911.0001
Tween 20	Sigma Chemie GmbH, P-1379

3.1.2 Antibiotika und Sulfonamide

4-Epichlorotetracycline hydrochloride	Janssen Chimica (Belgien), 26.823.51
4-Epitetracycline hydrochloride	Acros Organics, 23312-1000
Amoxicillin	Sigma Chemie GmbH, A-8523
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, A-9518
Cefacetril, Natriumsalz	Novartis Tiergesundheits GmbH, 97120050Z1
Cefadroxil, wasserfrei	ICN Biochemicals, 150581
Cefazolin, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-5020
Cefoperazone, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-4292
Cefotaxim, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-7912
Cefquinomsulfat, wasserfrei	Hoechst
Ceftiofur-Natrium (Excenel®)	Pharmacia & Upjohn GmbH, 801986000
Cefuroxim, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-4417
Cephalexin Hydrat	Sigma Chemie GmbH, C-4895

Cephalonium	Schering-Plough (Irland)
Cephapirin, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-8270
Chinolinsäure	Aldrich Chemie GmbH, 506346-154
Chlortetracyclin Hydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, C-4881
Ciprofloxacin	Sequoia Research Products Ltd. (UK), SRP03565c
Clavulansäure	Apin Chemicals Ltd., 25145
Cloxacillin, Natriumsalz Monohydrat	Sigma Chemie GmbH, C-9393
Danofloxacin	Sequoia Research Products Ltd. (UK), SRP00900d
Demeclocyclin	Sigma Chemie GmbH, D-6140
Dicloxacillin, Natriumsalz Monohydrat	Sigma Chemie GmbH, D-9060
Difloxacin	Sequoia Research Products Ltd. (UK), SRP02930d
Dihydrostreptomycin-Sesquisulfatsalz	Sigma Chemie GmbH, D-7253
Doxycycline Hydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, D-9891
Enrofloxacin	Seqoia Research Products Ltd. (UK), SRP01088e
Epioxytetracycline	Acros Organics, 25771-1000
Erythromycin	Sigma Chemie GmbH, E-6376
Flumequin	Sigma Chemie GmbH, F-7016
Levofloxacin	Fluka Chemika GmbH (Schweiz), 28266
Lomefloxacin Hydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, L-2906
Marbocyl®FD	Vetoquinol GmbH (Frankreich)
Nafcillin, Natriumsalz Monohydrat	Sigma Chemie GmbH, N-3269
Nalidixinsäure	Sigma Chemie GmbH, N-8878
Neomycin	Sigma Chemie GmbH, N-5285
Norfloxacin	Sigma Chemie GmbH, N-9890
Ofloxacin	Sigma Chemie GmbH, O-8757
Oxacillin, Natriumsalz Monohydrat	Sigma Chemie GmbH, O-1002
Oxolinsäure	Sigma Chemie GmbH, O-0877
Oxytetracyclin Hydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, O-5875
p-Aminobenzoic Acid (PABA)	Sigma Chemie GmbH, A-9878
Penicillin G, Natriumsalz (Benzylpenicillin)	Sigma Chemie GmbH, PEN-NA
Penethamathydrojodid (Ingel-Mamyzin®)	Boehringer Vetmedica GmbH
Piperacillin, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, P-8396

Rolitetracyclin	Sigma Chemie GmbH, R-2253
Sarafloxacin	Sequoia Research Products Ltd. (UK), SRP01073s
Sparfloxacin	Fluka Chemika GmbH (Schweiz), 56968
Spectinomycin	Sigma Chemie GmbH, S-9007
Spiramycin	Sigma Chemie GmbH, S-9132
Streptomycin-Sulfat	Sigma Chemie GmbH, S-6501
Sulfabenzamid	Sigma Chemie GmbH, S-9757
Sulfadiazin	Sigma Chemie GmbH, S-8626
Sulfadimethoxin	Sigma Chemie GmbH, S-7007
Sulfameter	Sigma Chemie GmbH, S-0383
Sulfamethazin	Sigma Chemie GmbH, S-6256
Sulfamethizol	Sigma Chemie GmbH, S-5632
Sulfamethoxypyridazin (SMOP)	Sigma Chemie GmbH, S-7257
Sulfapyridin	Sigma Chemie GmbH, S-6252
Sulfaquinoxalin	Sigma Chemie GmbH, S-7382
Sulfathiazol, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, S-9876
Sulfisoxazol	Sigma Chemie GmbH, S-6377
Tetracycline Hydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, T-3383
Trimethoprim	Sigma Chemie GmbH, T-7883

3.1.3 Puffer und Lösungen

2 % Casein/PBS-Lösung	(2 g Natriumcaseinat/100 ml PBS)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Chemie GmbH, B-2518
Helmanex®	Hellma GmbH, 320.000
Waschlösung	(0,15 mol/l Natriumchlorid mit Zusatz von 0,025 % Tween)
PBS	(0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid; pH 7,3)
SuperSignal ELISA Femto	Pierce Chem. Company, 37075

3.1.4 Immunreagenzien

Die monoklonalen Antikörper gegen Ampicillin (Klon 3B5), Cloxacillin (Klon 1F7), Streptomycin (Klon 4E2), Sulfadiazin (Klon 2G6) und Sulfamethazin (Klon 4D9), sowie die entsprechenden Festphasenantigene wurden im Rahmen früherer Untersuchungen am Institut entwickelt (MÄRTLBAUER et al., 1994; DIETRICH et al., 1998) und standen für die vorliegende Arbeit als affinitätschromatographisch gereinigte Präparationen zur Verfügung. Auch die Festphasenantigene für Sulfamethazin (SMA-PJ-GlcOx) und Sulfadiazin (SDA-HS-C-GlcOx 2) sowie für Cloxacillin (Cloxa-GlcOx) wurden bereits am Institut entwickelt (STRASSER, 2003). Festphasenantigene für Penicillin G (Pen-NHS-OVA 2) und für TNT (TNP-N-C4-BSA) wurden am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München entwickelt (KNECHT et al., 2004; EIBERLE, 2004) und standen ebenfalls zur Verfügung.

Cephapirin, mAb (Klon CH2025)	SilverLake Research (USA)
Cephapirin-BSA	SilverLake Research (USA), CH2025/BSA-01
Erythromycin, mAb (Klon CH2012)	SilverLake Research (USA)
Erythromycin-BSA	SilverLake Research (USA), CH2012/BSA-06
Gentamicin, mAb (Klon CH2032)	Acris Antibodies GmbH
Gentamicin-BSA	Acris Antibodies GmbH, BM 2099
Neomycin, mAb (Klon CH2021)	SilverLake Research (USA)
Neomycin-BSA	SilverLake Research (USA), CH2021/BSA-07
Penicillin G, mAb (Klon 48400)	Capricorn Products LLC (USA), PEN-018-48400
TNT, mAB (Klon A/1.1.1)	Strategic Diagnostics (USA), D1903M000-AM
Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase	DakoCytomation (Dänemark), P 0161

3.1.5 Spezielle Geräte

Charm II 6600 Analyzer	Charm Sciences Inc. (USA)
Charm ROSA Reader	Charm Sciences Inc. (USA)
Charm Sciences Precision Pipette	Charm Sciences Inc. (USA)
Finnpipette	Thermo Electron Corporation (Finnland)
Heraeus Labofuge 200	Kendro Laboratory Products GmbH

Inctronic II Incubator	Charm Sciences Inc. (USA)
Maxi Mix II	Barnstead /Thermolyne (USA)
Nanopipettiersystem NPS 8 Vers.1.03	GeSiM
Parallux Processor	IDEXX Laboratories (USA)
PASA System („Immunomat“)	Institut für Wasserchemie u. Chemische Balneologie der Technischen Universität München
Microprocessor pH-Meter	WTW
Printer Model 1220	Weigh-Tronix Inc. (Canada)
Repipet II Dispensers	Barnstead /Thermolyne (USA)
ROSA Quad-Incubator	Charm Sciences Inc. (USA)
Vortex VF 2	Jahnke und Kunkel GmbH & CoKG

3.1.6 Software

Avis FITS viewer	MSB di e F. Cavicchio (Italien)
SigmaPlot 9.0	Systat Software Inc.
Total Lab Vers. 2003	Biostep GmbH (deutsche Version)

3.1.7 Spezielle Materialien und Reagenzien

5 ml Finn Tip	Charm Sciences Inc. (USA)
10 ppb Sulfamethazine Standard	Charm Sciences Inc (USA)
Cap, Plug Type, 13 mm natural P.E.	Tyco Healthcare Group LP (USA)
Cotton Tipped Applicators	Puritan Medical Products (USA)
Glass Test Tubes, 13 mm	Charm Sciences Inc. (USA)
MRL Multi-Antimicrobial Standard	Charm Sciences Inc (USA)
Nexterion™ Slide E	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Nunc Immunomodul U8 Maxisorp	Nunc A/S (Dänemark)
Opti-Fluor Szintillations-Lösung	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (USA)
Parallux Negative Control	IDEXX Laboratories (USA)
Parallux Negative Control Diluent	IDEXX Laboratories (USA)
Zero Control Standard	Charm Sciences Inc (USA)

3.1.8 Testsysteme

Charm II Beta Lactam Test (MRL)	Charm Sciences Inc (USA)
Charm II Test for Sulfa Drugs in Milk	Charm Sciences Inc (USA)
Charm II Tetracycline Test	Charm Sciences Inc (USA)
Charm ROSA Beta-lactam	Charm Sciences Inc (USA)
Charm ROSA Enroflox Test	Charm Sciences Inc (USA)
Charm ROSA Tetracycline Test	Charm Sciences Inc (USA)
Charm SDSM ROSA	Charm Sciences Inc (USA)
Parallux Beta-lactam-Assay	IDEXX Laboratories (USA)
Parallux Sulfa Trio/Tetracycline Combination Assay	IDEXX Laboratories (USA)

3.1.9 Mikrobiologische Testsysteme

BRT Hemmstofftest	AiM Analytik in Milch GmbH
BRT MRL-Suchtest	AiM Analytik in Milch GmbH
BR-Test AS-Brilliant 96x1	DSM Food Specialties (Niederlande)
BR-Test AS-Spezial	DSM Food Specialties (Niederlande)
Delvotest SP	DSM Food Specialties (Niederlande)

3.1.10 Probenmaterial

Hemmstofffreie Rohmilch aus der Herde des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim der Tierärztlichen Fakultät; die Milch genügte den Anforderungen der IDF-Leitlinie ISO/FDIS 18330/IDF 188:2002: Mischmilch von sieben unbehandelten Kühen (letzte Behandlung vor > 8 Wochen), Zellgehalt < 150 000 somatische Zellen/ml Milch, Milchleistung > 5 kg Milch/Tag, Mittlaktation;

Hemmstofffreie Konsumvollmilch, 3,8 % Fettgehalt, pasteurisiert;

Hemmstoff-positive und hemmstoff-negative Anlieferungsmilchproben aus der Untersuchungstätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V.;

Hemmstofffreie Schaf- und Ziegenmilch aus Herden bayerischer Kleinbetriebe;

Hemmstofffreie Kamelmilch vom Central Veterinary Research Laboratory, Dubai;

Alle Proben wurden bis zur Untersuchung bei -18°C gelagert, am Tag der Untersuchung im Wasserbad bei 43°C aufgetaut und innerhalb von maximal 2 Tagen untersucht.

3.2. Untersuchungen und Ergebnisse

3.2.1 Methodische Grundlagen

3.2.1.1 Herstellung der Stammlösungen und Probenvorbereitung

Zur Herstellung künstlich kontaminierter Milchproben wurde hemmstofffreie Rohmilch mit verschiedenen Antibiotika- bzw. Sulfonamidkonzentrationen dotiert. Hierzu wurde für die entsprechenden Substanzen zunächst eine Stammlösung (1 mg/ml) hergestellt, wobei ca. 3-13 mg der Substanz eingewogen und in einem Glasfläschchen (Volumen 20 ml) unter Berücksichtigung des Salzanteils in PBS gelöst wurden. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde einigen Substanzen NaOH (2 mol/l) bzw. HCl (5 mol/l) zugesetzt. Aus diesen Lösungen wurden Gebrauchslösungen in PBS mit den erwünschten Konzentrationen an Antiinfektiva hergestellt und Rohmilch durch Zugabe von 20 µl Antibiotikalösung auf 1 ml Milch künstlich kontaminiert. Stamm- und Gebrauchslösungen wurden täglich frisch hergestellt.

Die Methode zur Derivatisierung von Ceftiofur zu Desfuroylceftiofur wurde aus KOSHY und CAZERS (1997) entnommen. Nach Herstellung einer Extraktionslösung (0,4 % Dithioerythritol in Boratpuffer mit pH 9) wurden 10 mg Ceftiofur in 10 ml Extraktionslösung gelöst, gemischt und 15 min bei 50°C im Wasserbad erhitzt. Die fertige Lösung wurde in lichtundurchlässigen Fläschchen bei -80°C aufbewahrt. Die Herstellung von Benzylpenicilloylsäure (BPO) aus Benzylpenicillin (Penicillin G) wurde nach FLOSS (1997) durchgeführt. Zur Hydrolyse wurden einer Penicillin-Stammlösung (1 mg/ml Methanol) 20 µl NaOH (1 mol/l) zugegeben. Nach einer Inkubation für 48 Stunden bei Raumtemperatur wurde eine Neutralisation mit 17,2 µl HCl (1 mol/l) durchgeführt. Die hergestellte Lösung wurde bei -18°C aufbewahrt.

3.2.1.2 Handhabung und Auswertung der Testsysteme

Die Vorgaben der Hersteller zur Testdurchführung wurden bei der Verwendung der verschiedenen Testsysteme grundsätzlich befolgt.

3.2.1.2.1 Charm II

Testvorbereitung:

1. Bestimmung des Kontrollpunktes der verwendeten Charge für jeden Nachweis:

a) Bestimmung des „Zero Control Average“ (= Mittelwert der Negativkontrollen) durch Messung von sechs (Beta-laktam-Nachweis) bzw. drei (Sulfonamid-/Tetracyclin-Nachweis) Replikaten des negativen Kontrollstandards (ZCS) und Berechnung des Mittelwerts der CPM (= counts per minute)

b) Bestimmung des „Positive Control Average“ (= Mittelwert der Positivkontrollen) durch Messung von drei (Beta-laktam-Nachweis) bzw. sechs (Sulfonamid-/Tetracyclin-Nachweis) Proben des positiven Kontrollstandards (MRL-Standard/Sulfamethazin Standard) und Berechnung des Mittelwerts der CPM

c) Bestimmung des eigentlichen Kontrollpunktes durch:

- Beta-laktam-Nachweis: Subtraktion von 20 % vom Mittelwert der Negativkontrollen
- Sulfonamid-Nachweis: Addition von 24 % zum Mittelwert der Positivkontrollen
- Tetracyclin-Nachweis: Addition von 23 % zum Mittelwert der Positivkontrollen

2. Vorheizen des Heizblocks:

- Beta-laktam-Nachweis: 65 ± 2°C
- Sulfonamid-Nachweis: 85 ± 2°C
- Tetracyclin-Nachweis: 35 ± 2°C

3. Kühlung der Proben auf 4 ± 2°C

4. Tägliche Überprüfung des Kontrollpunktes („Performance Check“) für jeden Nachweis, der durchgeführt werden soll

Testdurchführung:

Tabelle 2 zeigt vergleichend die unterschiedlichen Testdurchführungen der Charm II-Nachweise für Beta-laktame, Sulfonamide und Tetracycline.

Tabelle 2: Vergleichende Darstellung der Testdurchführungen der verschiedenen Charm II-Nachweise

Arbeitsschritt	**Beta-laktam-Nachweis**	**Sulfonamid-Nachweis**	**Tetracyclin-Nachweis**
Rezeptortablette:	grün	weiß	weiß
Zugabe von 300 ± 100 µl A. dest. zur Tablette und Mischen für mindestens 10 Sekunden			
Zugabe von:	Probe (5,0 ± 0,25 µl)	Probe (5,0 ± 0,25 µl) + Tracer-Tablette (rosa) + Mischen	Probe (5,0 ± 0,25 µl) + Tracer-Tablette (orange) + Mischen
Inkubation:	65 ± 2°C		
Zugabe von:	Tracer-Tablette (gelb) + Mischen		
Inkubation:	65 ± 2°C	85 ± 2°C	35 ± 2°C
Zentrifugation:	3 min	3 min	5 min
Sofortiges Abkippen der Milch und Entfernung des Fettringes mittels Wattestäbchen			
Zugabe von 300 ± 100 µl A. dest.; Mischen, um das Sediment zu lösen			
Zugabe von 3,0 ± 0,5 ml Szintillationsflüssigkeit; Mischen			
Messung u. Ablesen des Ergebnisses:	im ^{14}C-Kanal	im ^{3}H-Kanal	im ^{3}H-Kanal

Auswertung

Die Auswertung des Charm II orientiert sich an dem vorher bestimmten Kontrollpunkt für die entsprechende Substanz. Dieser wird im Falle der Beta-laktame aus negativen, im Falle der Sulfonamide und Tetracycline aus positiven Kalibrationsmessungen berechnet.

- **negativ** („not found“): CPM (Probe) > Kontrollpunkt
- **positiv** („positive“): CPM (Probe) ≤ Kontrollpunkt

Positive Proben sollten laut Hersteller durch Wiederholung der Messung verifiziert werden, wobei die Proben eventuell verdünnt werden müssen (Sulfonamide 1:10; Tetracycline 1:3). Zur Sicherstellung der Funktionsfähigkeit des Gerätes und der Testreagenzien sollte nochmals eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgemessen werden.

3.2.1.2.2 Charm ROSA

Testvorbereitung:

1. Vorheizen des Heizblocks auf 56 ± 1°C bzw. bis der Temperaturindikator grün verfärbt ist
2. Tägliche Kalibrierung des ROSA Readers mittels mitgeliefertem Kalibrationsstick und angefertigter Positiv- und Negativkontrolle

Testdurchführung:

1. Teststreifen mit der flachen Seite nach oben in den Inkubator legen; Schutzfolie entfernen
2. Zugabe von 300 µl ± 15 µl Probe in die Vertiefung des Teststreifens
3. Verschließen des Teststreifens und des Inkubators
4. Inkubation für acht Minuten bzw. bis zum Signalton

Auswertung:

Der Charm ROSA Test kann sowohl visuell als auch instrumentell ausgewertet werden. Bei der **visuellen Auswertung** wird nach Entnahme des Teststreifens aus dem Inkubator die Testlinie („T“ bzw. beim Charm SDSM ROSA Test für Sulfonamide „D“ und „M“) mit der Kontrolllinie („C“) verglichen.

- **negativ:** Kontrolllinie stärker ausgeprägt als Testlinie oder beide gleich stark ausgeprägt
- **positiv:** Testlinie sichtbar heller als Kontrolllinie oder Testlinie nur teilweise vorhanden, wobei es beim Charm SDSM ROSA Test für Sulfonamide ausreicht wenn dies auf eine der beiden Testlinien zutrifft
- **ungültig:** Kontrolllinie fehlt, ist verschmiert oder ungleichmäßig ausgebildet; Milch überdeckt die Kontroll- oder Testlinie

Für die **instrumentelle Auswertung** steht ein Lesegerät (ROSA Reader) zur Verfügung. Hierbei wird ebenfalls die Farbintensität der entsprechenden Linien miteinander verglichen.

- **negativ:** Zahl auf dem Display ≤ 0
- **positiv:** Zahl auf dem Display > 0

Positive Proben müssen laut Hersteller nochmals getestet werden. Zur Sicherstellung der Funktionsfähigkeit des Gerätes und der Testreagenzien sollten nochmals eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgemessen werden.

3.2.1.2.3 Parallux

Testvorbereitung:
Tägliche Kalibration des Gerätes durch zweifache Messung des negativen Kontrollstandards nach Anweisung auf dem Display des Messinstruments.

Testdurchführung:
Die Durchführung eines Tests mittels Parallux wird dadurch vereinfacht, dass alle Arbeitsschritte auf dem Display angezeigt werden:

1. Wahl des Menüpunktes „Test“; Barcode der Testkartusche einscannen; Eingabe der Probennummer und der untersuchenden Person über das Bedienfeld
2. Kartusche und Tablett mit Antikörpern einlegen
3. jeweils 100 µl ± 5 µl Probe pro Kavität zu den Antikörpern eingeben und bestätigen; Mischen; die Probenaufnahme in die mit Antigen beschichteten Kapillaren der Kartusche, eine zweiminütige Inkubation und ein Waschschritt erfolgen automatisch
4. Einlegen der Kartusche in die Zentrifuge; Zentrifugieren und Ablesen des Ergebnisses erfolgen automatisch

Auswertung:
Die Auswertung des Parallux erfolgt automatisch über den Vergleich der Messung mit dem Kontrollpunkt („Ratio“).

- **negativ:** Ratio (Probe) ≤ 1.00
- **positiv:** Ratio (Probe) > 1.00
- **ungültig (U):** Testergebnis kann aus verschiedenen Gründen nicht abgelesen werden

Positive Ergebnisse müssen laut Hersteller verifiziert werden. Der Parallux Processor verfügt hierfür über eine eigene Funktion („Confirmation“), mit der das Ergebnis einer

Wiederholungsmessung mit dem der vorhergegangenen Probe sowie mit einer gleichzeitig durchgeführten Positiv- und Negativkontrolle verglichen werden kann.

3.2.1.2.4 Immunomat

Testvorbereitung:

1. Herstellung der Festphasenantigen-Lösungen. Vorlegen in den entsprechenden Konzentrationen in die Kavitäten einer mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung abgesättigten Mikrotiterplatte und Bespotten der Chips nach einem vorher festgelegten „Spottingprotokoll“ (siehe 3.2.2.2.1).

2. Herstellung der Testreagenzien:
(alle Reagenzien müssen temperiert sein)

- Antikörper-Lösung in FCS/A. dest. (1:1)
- Sekundärantikörper-Lösung in FCS/A. dest. (1:1)
- Waschpuffer / 2 %-ige Casein-Lösung (4:1)

3. Abspülen der gespotteten Chips mit A. dest. und Blocken mit 2 %-iger Casein-Lösung

4. Vorbereitungen am Messgerät:

- Reinigung des Glasfensters der Flusszelle mit 2 %-iger Helmanex-Lösung und A. dest.
- Blocken des Glasfensters mit 2 %-iger Casein-Lösung
- Schläuche und Flusszelle mit A. dest. spülen
- Reagenzien am Gerät anbringen und Pumpen aktivieren
- vor jeder Messreihe wird ein Chip mit negativer Milch gemessen

Testdurchführung:

1. Einlegen des Chip
2. Messung (Reagenzienzufuhr erfolgt automatisch)
3. Bildverarbeitung
4. nach den Messungen: System mit A. dest. und 2 %-iger Helmanex-Lösung spülen

Auswertung:

Die Auswertung der Ergebnisse des Immunomaten kann sowohl visuell als auch instrumentell erfolgen.

Bei der **visuellen Auswertung** werden die Spotintensitäten der Testreihe mit den Spotintensitäten der zugehörigen Referenzreihe verglichen.

- **negativ:** Spotintensität Testreihe ≥ Spotintensität Referenzreihe
- **positiv:** Spotintensität Testreihe < Spotintensität Referenzreihe

Für die **instrumentelle Auswertung** der Mikroarrays stand aus früheren Arbeiten (KNECHT et al., 2004; EIBERLE, 2004) eine Methode zur Verfügung, die durch Erstellung einer Kalibrierkurve eine quantitative Auswertung der Messergebnisse ermöglicht. Da diese Auswertemethode jedoch sehr komplex ist und quantitative Messungen nicht Bestandteil der Arbeit waren, wurde sie für die Bearbeitung der eigenen Messergebnisse nicht angewendet.

3.2.1.2.5 Mikrobiologische Testsysteme

Testvorbereitung:

Vorheizen des Wasserbads auf 64 ± 0,5°C

Testdurchführung:

1. Entfernung der Schutzfolie von den Testpackungen und im Falle des Delvo SP Eingabe von je einer Nährstofftablette pro Kavität mittels Dispenser
2. Eingabe von 100 µl Probenmaterial pro Kavität sowie Positiv- und Negativkontrolle; jeweils doppelter Ansatz
3. Wasserdichtes Verschließen der Kavitäten
4. Inkubation im Wasserbad für ca. 2-3 Stunden bzw. bis eine sichtbare Farbänderung der Negativkontrolle erkennbar
5. Entfernung der Milch aus den Kavitäten und Beurteilung des Farbumschlages

Auswertung:

Die **visuelle Auswertung** der mikrobiologischen Hemmstofftests entsprach der in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG beschriebenen Methode L 01.01-11 (Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch) bzw. L 01.00-51 (Delvotest SP)

- **negativ:** Kavität weist den selben Farbton wie die Negativkontrolle auf (gelb)
- **positiv:** Farbton der Kavität weicht vom Farbton der Negativkontrolle ab (blau/violett)

Eine **instrumentelle Auswertung** wurde in eigenen Untersuchungen nicht durchgeführt.

3.2.1.2.6 Modifizierter Agardiffusionstest mit *E .coli*

Testvorbereitung, Testdurchführung und Auswertung erfolgten wie bei GÄRTNER et al. (2004) beschrieben. Dieser Test wurde insbesondere zum Nachweis von Chinolonen eingesetzt.

3.2.2 Untersuchungen zur Funktionalität der verschiedenen Testsysteme

3.2.2.1 Gegenüberstellung der wichtigsten Parameter

Tabelle 3 stellt die wichtigsten Parameter der verschiedenen Testsysteme gegenüber. Es wurde besonders auf den Umfang des mitgelieferten Zubehörs, Standards, Testreagenzien und Probenparameter Bezug genommen.

Tabelle 3: Vergleichende Zusammenstellung charakteristischer Parameter der überprüften Testsysteme

Parameter	**Charm II (6600)**	**Charm ROSA**	**Parallux**	**Immunomat**[1]
Anwendungsbereich:	*Beta-laktam-/Sulfonamid-Test:* Rohmilch *Tetracycline:* Rohmilch sowie bearbeitete Milch	Rohmilch	Rohmilch	k.A.
Quantifizierbarkeit:	ja	nein	nein	semiquantitativ
Preis Messgerät[2]:	25 250 € (incl. Zubehör)	2725 € (Inkubator, Reader)	ca. 8000 €	noch nicht festgelegt
Zubehör:				
technisches Zubehör:	Heizblock, Zentrifuge, Arbeitsplatz mit Vortex, Messgerät, Printer, spezielle Pipetten	Inkubator, Lesegerät mit speziellem Kalibrations-Stick, Printer auf Nachfrage, Spezialpipette	Barcode-Scanner, Messgerät mit integriertem Lesegerät und Printer, kalibrierte Pipette	Messgerät mit CCD-Kamera, Laptop zur Steuerung und Auswertung
sonstiges Zubehör:	Glasteströhrchen mit Spezialdeckelchen und Spezialständer, Tabletten-spender, Wattestäbchen, Szintillationsflüssigkeit, Kalibrationsstandards, Testreagenzien	Kalibrationsstandards, Testreagenzien	Waschlösung, Kalibrationsstandard, Testreagenzien	Glas-Biochips, Testreagenzien (teilweise selbst herzustellen)
Standard:				
Anzahl d. Kalibrierungen:	1 x täglich	1 x täglich	1 x täglich	vor jeder Messreihe
Testverbrauch/Kalibrierung:	2	2	2	1
kommerziell erhältliche Kalibrierstandards:	negativ und positiv	positiv	negativ und positiv[3]	keine

Fortsetzung Tabelle 3: Vergleichende Zusammenstellung charakteristischer Parameter der überprüften Testsysteme

Parameter	**Charm II (6600)**	**Charm ROSA**	**Parallux**	**Immunomat**[1]
Lagerung der Standards (Herst. angaben):				
trocken (MHD):	0-4,4°C	0-7°C	0-29°C	
rekonstituiert:	negativ: 0-4,4°C; 3 Tage -15°C; 2 Monate positiv: 0-4,4°C; 2 Tage -15°C; 2 Monate	0-7°C; 48 Std -15°C; 2 Monate	0-7°C; 8 Tage	
<u>Testreagenzien:</u>				
Morphologie der Testreagenzien:	Tracer- und Rezeptor-proteintabletten (in unterschiedl. Farben)	Teststreifen (in unterschiedl. Farben)	Testkartuschen	Reagenzienlösungen und Biochips
Langzeitlagerung der Testreagenzien (Herstellerangaben):	-15°C	0-7°C	0-7°C	Konjugate: -15°C Antikörper: 0-7°C Biochips: Raumtemperatur
Simultan bestimmbare Substanzen/-gruppen pro Testeinheit:	1	4	4	10
Preis Testkit (Stückpreis)[2]:	5-6 €	Beta-laktame: 2,55 € Sulf., Tetra., Enroflox.: 4,55 €	Beta-laktame: 3,10 € Tetra/Sulf: 9,80 €	Chip: ca. 10,- €

Fortsetzung Tabelle 3: Vergleichende Zusammenstellung charakteristischer Parameter der überprüften Testsysteme

Parameter	Charm II (6600)	Charm ROSA	Parallux	Immunomat[1]
Probenparameter:				
Anzahl der simultan messbaren Proben:	12	4	1	1
Probenvolumen:	5 ml	300 µl	400 µl	ca. 1 ml
vorgeschriebene Probentemperatur:	0-7°C	0-7°C	0-29°C	Raumtemperatur
Testparameter:				
Anzahl der Arbeitsschritte:	9 bis 11	4	4	4
Dauer d. Testdurchführung:	15-20 min	8 min	4 min	3 min
Arbeitanleitung:	persönl. Schulung und schriftl., bebilderte Arbeitsanleitung	schriftl., bebilderte Arbeitsanleitung	persönl. Schulung und schriftl. Arbeitsanleitungen	institutsinternes Protokoll
Laborkenntnisse erforderlich:	Grundlagen	nein	nein	ja, da Reagenzien noch nicht konfektioniert
Anzeige Testende:	Signalton	Signalton	Signalton	Bild wird angezeigt
Haltbarkeit des Ergebnisses (Herstellerangaben):	keine Angabe	Raumtemperatur: 10min 0-4,4°C: 1 Std. -15°C: 1 Woche	keine Angabe	keine Angabe

[1] Angaben können Änderungen unterliegen, da Prototyp
[2] Quelle: IDEXX Lab. bzw. MCS Diagnostics, Stand: Mai bzw. Sept. 2005; Änderungen möglich durch Mengenrabatte, MWSt.-Zuschlag etc.; alle Angaben ohne Gewähr
[3] in eigenen Untersuchungen nicht verwendet

3.2.2.2 Vorversuche für die Messungen mittels Immunomat

3.2.2.2.1 Erstellung eines „Spottingprotokolls“

In verschiedenen Vorversuchen wurden die Eignung verschiedener Festphasenantigene sowie die optimalen Konzentrationen für Festphasenantigene und die entsprechenden Antikörper ermittelt. Aus den Ergebnissen wurde ein „Spottingprotokoll“ erstellt, welches für alle durchgeführten Testläufe verwendet wurde. Als „Spotting“-Puffer wurde PBS bzw. nach KNECHT et al. (2004) 0,002 %-ige Casein/PBS-Lösung verwendet, um die Ausbildung der Spots zu verbessern. Als Referenzkonjugat wurde N-(2,4,6-Trinitrophenyl)-N-buttersäure-BSA (TNP-N-C4-BSA) nach EIBERLE (2004) verwendet, als entsprechender Referenz-antikörper diente TNT mAb (Klon A/1.1.1). Tabelle 4 zeigt das erstellte „Spottingprotokoll“.

Tabelle 4: Verwendetes „Spottingprotokoll“ für Messungen mittels Immunomaten; es zeigt die Anordnung der Festphasenantigene auf dem Biochip sowie die verwendeten Konzentrationen von Festphasenantigenen und entsprechenden Antikörpern

Reihe	Nachweis	Festphasenantigen		Antikörper	
		Bezeichnung	Konz. (µg/ml)	Klon	Konz. (µg/ml)
1	TNT	TNP-N-C4-BSA	26,98	A/1.1.1	0,072
2	Cloxacillin	Cloxa-GlcOx	44,14	1F7	0,179
3		TNP-N-C4-BSA	26,98		
4	Cephapirin	Cepha-BSA	13,68	CH2025	2,373
5		TNP-N-C4-BSA	26,98		
6	Sulfadiazin	SDA-HS-C-GlcOx 2	101,34	2G6	0,192
7		TNP-N-C4-BSA	26,98		
8	Streptomycin	Strep-Ox-C-GlcOx 2	20,69	4E2	1,31
9		TNP-N-C4-BSA	26,98		
10	Sulfamethazin	SMA-PJ-GlcOx	12,12	4D9	0,438
11		TNP-N-C4-BSA	26,98		
12	Gentamicin	Genta-BSA	54,44	CH2032	5,632
13		TNP-N-C4-BSA	26,98		
14	Neomycin	Neo-BSA	209,02	CH2021	2,363
15		TNP-N-C4-BSA	26,98		
16	Erythromycin	Ery-BSA	64,46	CH2012	11,285
17		TNP-N-C4-BSA	26,98		
18	Ampicillin	Ampi-NHS-OVA	12,01	3B5	0,554
19		TNP-N-C4-BSA	26,98		
20	Penicillin G	Pen-NHS-OVA2	45,21	48400	1
21		TNP-N-C4-BSA	26,98		

Der verwendete, kommerzielle Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-peroxidase) wurde für die Messungen 1:300 mit Fetalem Kälberserum (FCS) verdünnt.

3.2.2.2.2 Überprüfung möglicher Reaktionen zwischen Antikörpern und Festphasenantigenen gleicher Substanzklassen

3.2.2.2.2.1 Durchführung

Da bei den späteren Messungen mittels Immunomat die Verwendung eines Antikörpergemisches als Detektionsreagenz bei jeder Messung angestrebt wurde, war es im Hinblick auf die Auswertung der Ergebnisse wichtig, mögliche Reaktionen zwischen Antikörpern und Festphasenantigenen gleicher Substanzklassen zu überprüfen. Untersucht wurde dabei die Möglichkeit von Reaktionen zwischen dem Ampicillin-Antikörper (3B5) und dem Konjugat Pen-NHS-OVA bzw. dem Penicillin-Antikörper (48400) und dem Konjugat Ampi-NHS-OVA sowie dem Sulfadiazin-Antikörper (2G6) und dem Konjugat SMA-PJ-GlcOx bzw. dem Sulfamethazin-Antikörper und dem Konjugat SDA-HS-C-GlcOx 2. Dazu wurde für die Messung Biochips mit allen zu testenden Festphasenantigenen hergestellt und jeweils nur der zu überprüfende Antikörper zur Messung von hemmstofffreier Milch verwendet.

3.2.2.2.2.2 Ergebnisse

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde in geringem Maße eine Bindung des Ampicillin-Antikörpers (3B5) an das Penicillin-Konjugat (Pen-NHS-OVA) sowie eine Bindung des Sulfadiazin-Antikörpers (2G6) an das Sulfamethazin-Konjugat (SMA-PJ-GlcOx) festgestellt.

3.2.2.3 Entwicklung eines instrumentellen Auswerteverfahrens für die Messergebnisse des Immunomaten

Von einer Quantifizierung nach KNECHT et al. (2004) und EIBERLE (2004) mittels Kalibrierkurven wurde in dieser Arbeit abgesehen, da diese Auswertemethode in ihrer Durchführung äußerst komplex und hinsichtlich der Thematik einer Vergleichsuntersuchung wenig praktikabel schien. Für die Vergleichsuntersuchung stand bezüglich dieses Gerätes der Nachweis von Antibiotika auf MRL-Niveau im Vordergrund. Deshalb wurde eine vereinfachte Auswertemethode generiert, welche lediglich zwischen „positiv“ und „negativ“ unterscheiden sollte.

Prinzip:

Im ersten Schritt wurde der Bildhintergrund in der PASA-Software subtrahiert und das Bild mittels AVIS zur tif-Datei konvertiert. Die weitere Auswertung erfolgte mittels TotalLab, einem Programm für die Auswertung von DNA-Mikroarrays. Hiermit wurden die Pixelintensitäten der einzelnen Spots berechnet und in Zahlenwerten ausgedrückt. Nach Konvertierung zur Excel-Datei, wurde hier der Mittelwert jeder Spot-Reihe berechnet, wobei mindestens fünf der sieben Parallelwerte miteinbezogen wurden. Es wurden 15 Biochips nach obigem Protokoll gespottet und gemessen. Probenmaterial war hemmstofffreie Rohmilch. Die Messergebnisse wurden wie beschrieben eingelesen und bearbeitet. Aus den Mittelwerten der einzelnen Testreihen und der jeweils zugehörigen Referenzreihen wurde ein Quotient nach folgender Formel berechnet:

Quotient = Mittelwert (Referenzreihe) / Mittelwert (Testreihe)

Aus diesen Quotienten wurden wiederum die Mittelwerte aus den 15 Einzelmessungen gebildet, so dass für jeden Nachweis ein charakteristischer Zahlenwert ermittelt werden konnte. Um etwaige Inter-Assay-Varianzen auszugleichen sowie zur Vermeidung falsch-positiver Resultate wurden zu diesen Werten 25 % addiert. Der daraus resultierende Wert wurde dann als endgültiger „Kontrollpunkt“ für den entsprechenden Nachweis festgelegt.

Folgende „Kontrollpunkte“ wurden ermittelt:

Cloxacillin: 1,15	Sulfadiazin: 4,10	Streptomycin: 1,89	Erythromycin: 1,46
Cephapirin: 1,58	Sulfamethazin: 3,65	Gentamicin: 4,28	
Ampicillin: 1,60		Neomycin: 2,69	
Penicillin: 1,38			

Auswertung:

Die Auswertung der Ergebnisse des Immunomaten wurde mittels dem oben beschriebenen Auswerteverfahren folgendermaßen durchgeführt:

- **negativ:** Quotient (Antibiotikum des Testchip) ≤ Kontrollpunkt (Antibiotikum)
- **positiv:** Quotient (Antibiotikum des Testchip) > Kontrollpunkt (Antibiotikum)

3.2.2.3 Untersuchungen zur Haltbarkeit der Testergebnisse

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, lagen zu Beginn der Studie teilweise Herstellerangaben zur Haltbarkeit der Testergebnisse vor. Diese wurden überprüft, indem aus jedem Testkit der verschiedenen Testsysteme stichprobenweise fünf positive und fünf negative Proben ausgewählt und unter verschiedenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt wurden. Es wurden für jedes Testsystem alle verfügbaren Nachweise getestet.

Charm II

Da es zur Haltbarkeit der Ergebnisse dieses Testsystems keine Herstellerangaben gab, wurden verschiedene Lagerungsbedingungen untersucht:

- 18-24°C („Raumtemperatur“) unter Lichteinfluss; 24 Stunden
- 18-24°C („Raumtemperatur“) unter Lichtabschluss; 24 Stunden
- 0-7°C unter Lichtabschluss; 24 Stunden

Ergebnisse:

Im Allgemeinen war eine Lagerung der Ergebnisse des Charm II unter allen überprüften Bedingungen möglich. Einzig bei 18-24°C und Dunkelheit kam es zu 20 % falsch-negativen Ergebnissen für den Tetracyclin-Nachweis. Die negativen Proben wiesen keine falsch-positiven Ergebnisse unter den überprüften Lagerungsbedingungen auf. Die Ergebnisse für die positiven Proben zeigt Abbildung 6.

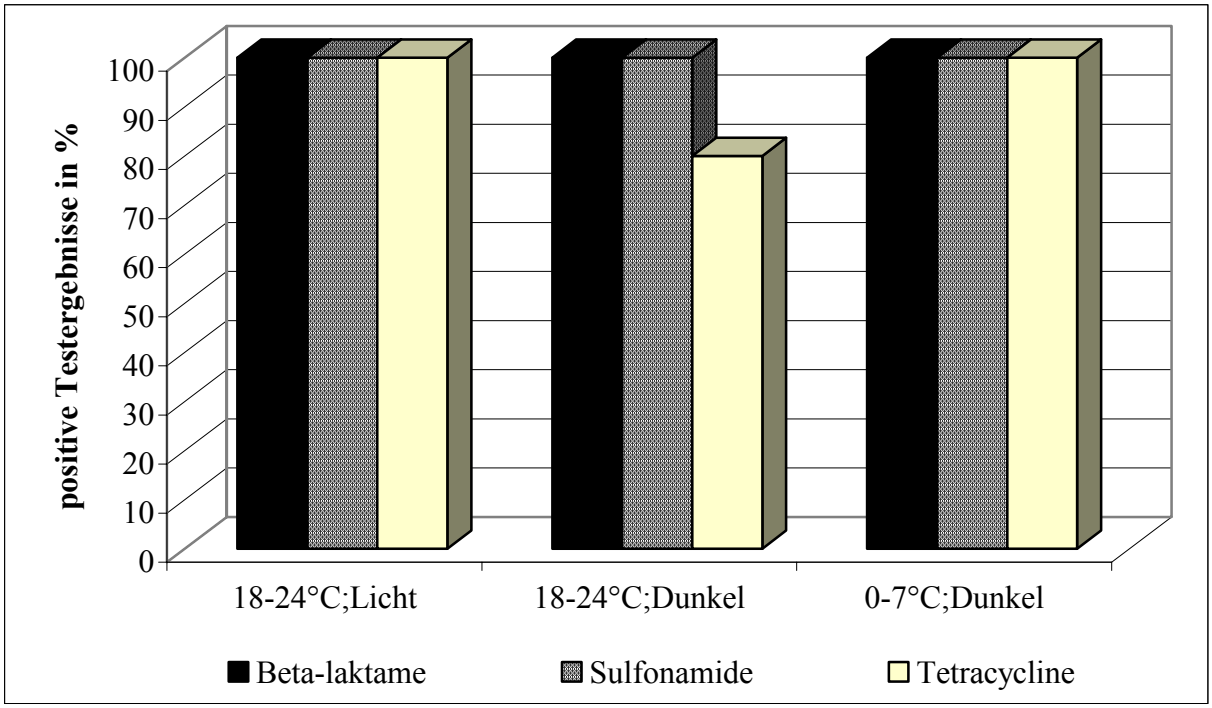


Abbildung 6: Prozentualer Anteil positiver Proben, die nach 24 Stunden Lagerung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen mittels Charm II immer noch positiv getestet wurden

Charm ROSA

Für dieses Testsystem lagen Herstellerangaben zur Ergebnishaltbarkeit unter verschiedenen Lagerungsbedingungen vor, welche überprüft wurden.

- 18-24°C („Raumtemperatur“); 10 min
- 0-4,4°C; 1 Stunde
- -18°C; 8 Tage

Ergebnisse:

Nach einer Lagerung bei 18-24°C für 10 min bzw. 0-4,4°C für eine Stunde war weder bei positiv noch bei negativ getesteten Teststreifen eine Veränderung der Ergebnisse feststellbar. Die Ergebnisse nach einer Lagerung bei -18°C; 8 Tage zeigt Abbildung 7. Es zeigte sich, dass sowohl die Beta-laktam-Teststreifen, vor allem aber die Tetracyclin-Teststreifen unter diesen Bedingungen zu falsch-negativen Ergebnissen neigten.

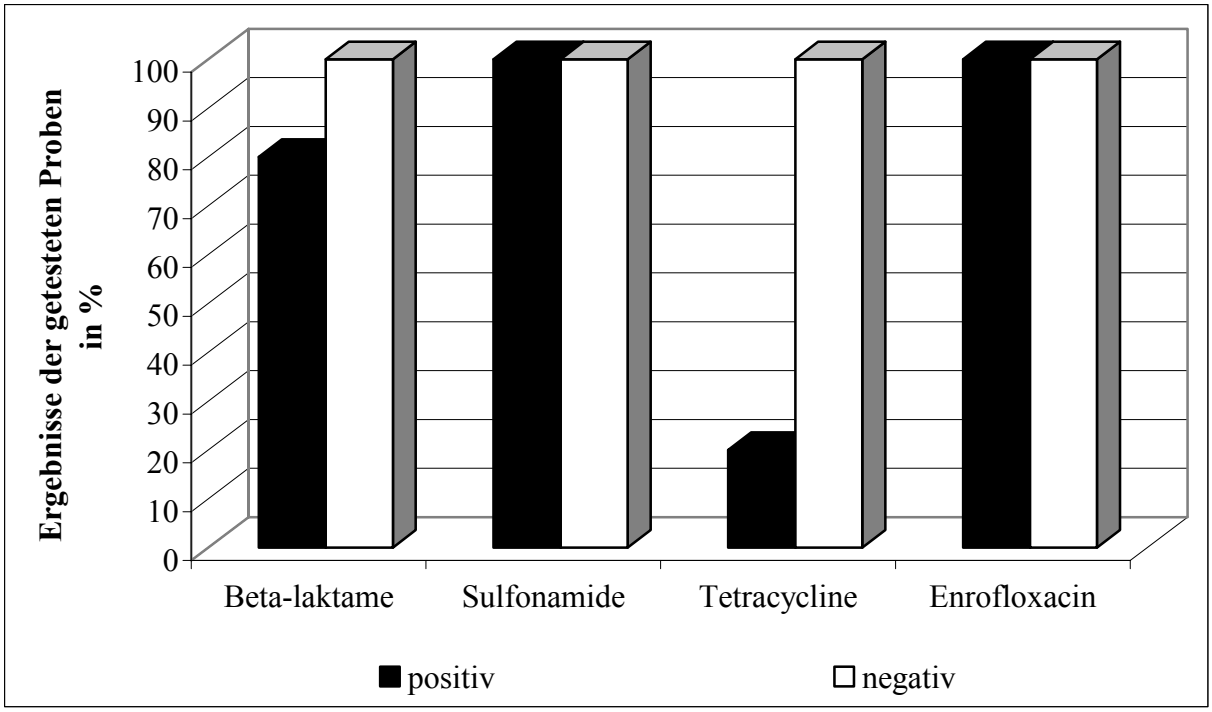


Abbildung 7: Prozentualer Anteil positiver und negativer Charm ROSA Teststreifen nach einer Lagerung bei -18°C; 8 Tage

Parallux

Da für dieses Testsystem keine Herstellerangaben zur Haltbarkeit der Testergebnisse vorlagen, wurde die Ergebnishaltbarkeit unter folgenden Lagerungsbedingungen getestet:

- 0-7°C; 24 Stunden
- -18°C; 24 Stunden

Ergebnis:

Es waren keine Veränderungen des Ergebnisses feststellbar, sowohl positive als auch negative Ergebnisse waren unter den überprüften Lagerungsbedingungen haltbar.

Immunomat

Hinsichtlich der Haltbarkeit der Ergebnisse des Immunomaten soll auf EIBERLE (2004) verwiesen werden. Hier wurden Versuche zur Umsetzung des Luminols durch Peroxidase durchgeführt, um Aussagen über die Empfindlichkeit der Reaktion zu erlangen. Dabei wurde ein Anstieg der Chemielumineszenz innerhalb von zehn Minuten Reaktionszeit gemessen.

Eigene Untersuchen zu diesem Thema wurden nicht durchgeführt, da sich die Einstellungsparameter bezüglich des Immunomaten in beiden Arbeiten entsprachen und deshalb keine neuen Erkenntnisse zu erwarten waren.

3.2.2.4 Überprüfung des Einflusses von Patentblau auf die Schnelltestsysteme

Zu Markierungszwecken werden alle Proben, die auf Hemmstoffe untersucht werden sollen, vom Milchprüfring e.V. mit Patentblau, einem Farbstoff, eingefärbt. Da viele der zu untersuchenden Praxisproben aus der Tätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. stammten, sollte ein möglicher Einfluss dieses Farbstoffes auf die Ergebnisse der Schnelltestsysteme überprüft werden.

3.2.2.4.1 Probenmaterial und Durchführung

Hierfür wurden vom Milchprüfring eingefärbte, als hemmstofffrei deklarierte Proben untersucht. Üblicherweise werden vor Probennahme ca. 100 µl der Patentblau-Lösung (0,5 mg/ml) in die Probengefäße vorgelegt, die Endkonzentration richtet sich demnach nach dem Probenvolumen. Ein Teil der Proben wurde je nach Nachweis mit Penicillin G (zusätzlich Cloxacillin, Ceftiofur und Cephapirin für den Beta-laktam-Nachweis des Parallux), Sulfamethazin (zusätzlich Sulfadimethoxin und Sulfathiazol beim Parallux) oder Tetracyclin auf MRL-Niveau künstlich kontaminiert. Die Durchführung der Testsysteme erfolgte wie in 3.2.1.2 beschrieben. Es wurden für jedes Testsystem drei Testansätze mit negativer Milch und drei mit künstlich kontaminierter, positiver Milch durchgeführt. Aus Mangel an Probenmaterial konnte der Einfluss des Farbstoffes auf den Immunomaten nicht überprüft werden.

3.2.2.4.2 Ergebnisse

Keines der überprüften Testsysteme zeigte falsch-negative Ergebnisse im Beta-laktam-Nachweis, wohingegen der Sulfonamid-Nachweis des Charm ROSA und der Tetracyclin-Nachweis von Charm II und Parallux falsch-negative Ergebnisse zeigten. Falsch-positive Testergebnisse wurden dagegen bei keinem System beobachtet.

3.2.2.5 Überprüfung des Einflusses von Penicillinase auf die Schnelltestsysteme

Die Zugabe von Penicillinase zu einer hemmstoff-positiv getesteten Probe, um das Vorliegen von Beta-laktam-Antibiotika von dem anderer Antiinfektiva abzugrenzen, ist eine im Labor routinemäßig durchgeführte Untersuchung. In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Funktionalität der verschiedenen Schnelltestsysteme durch die Anwesenheit von Penicillinase beeinflusst wird.

3.2.2.5.1 Probenmaterial und Durchführung

Um den Einfluss von Penicillinase auf die Schnelltestsysteme zu überprüfen, wurde hemmstofffreie Rohmilch mit den Zielsubstanzen Penicillin G, Cloxacillin, Dicloxacillin, Ceftiofur und Cephapirin auf MRL-Niveau künstlich kontaminiert. Für den Immunomaten wurden alle diejenigen Substanzen eingesetzt, für welche funktionsfähige Nachweise existieren. Dieser Milch wurden anschließend 10 µl eines Penicillinase-Konzentrates (10 Mio IU/ml) pro 100 µl Milch zugegeben. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle hemmstofffreie Rohmilch mit Penicillinase versetzt. Während einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur fand die Inaktivierungsreaktion statt. Es wurden jeweils drei Messungen im Beta-laktam-Nachweis durchgeführt, mittels Immunomat wurde nur ein Biochip gemessen. Die Durchführung der Schnelltestsysteme erfolgte wie in 3.2.1.2 beschrieben. Zur Überprüfung der Inaktivierung wurden die Proben zusätzlich mittels BRT MRL-Suchtest untersucht.

3.2.2.5.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse im BRT MRL-Suchtest waren für alle Proben negativ und zeigten damit eine Inaktivierung der Beta-laktam-Antibiotika durch das Enzym an. Sowohl die Messungen der dotierten Milchproben als auch die der Negativkontrollen zeigten bei Messung mittels Charm II durchweg positive Ergebnisse. Der Cloxacillin-Nachweis des Parallux-Systems reagierte ebenfalls positiv auf mit Cloxacillin und Dicloxacillin dotierte Milchproben, denen Penicillinase beigemischt war, die restlichen Nachweise wiesen jedoch negative Ergebnisse auf. Die Messung der Negativkontrollen ergab negative Ergebnisse in allen Nachweisen. Das Charm ROSA Testsystem wies keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse auf. Die Ergebnisse des Immunomaten waren aufgrund starker Schlierenbildung nicht auswertbar.

3.2.3 Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der Testsysteme

In diesem Versuchsabschnitt wurden für die verschiedenen Testsysteme die Herstellerangaben zur Sensitivität bezüglich einzelner Substanzen überprüft sowie die Nachweisgrenzen der Testsysteme bestimmt. Des Weiteren wurden eventuelle Kreuzreaktivitäten mit strukturähnlichen Antibiotika und Sulfonamiden ermittelt. Neben den nach VO (EWG) 2377/90 mit einem MRL-Wert belegten Antiinfektiva, wurden auch Derivate ohne MRL-Wert in die Untersuchungen miteinbezogen.

3.2.3.1 Mikrobiologische Hemmstofftestsysteme

3.2.3.1.1. Durchführung

Zusätzlich zu den Schnelltestsystemen wurden auch mikrobiologische Hemmstofftestsysteme (BRT MRL-Suchtest, BRT Hemmstofftest, Delvotest SP, BR-Test AS-Brilliant, BR-Test AS-Spezial) in die Vergleichsuntersuchung miteinbezogen, um gleichzeitig Referenzverfahren für die folgenden Messungen verfügbar zu haben. Neben den herkömmlichen kommerziellen, mikrobiologischen Hemmstofftests wurde ein modifizierter Agardiffusionstest (Testkeim *E. coli*) zum Nachweis der Chinolone in die Untersuchung miteinbezogen. Die Testdurchführung und Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2.5 beschrieben. Als Probenmaterial diente hemmstofffreie Rohmilch, welche mit den Zielsubstanzen in den entsprechenden Konzentrationen künstlich kontaminiert wurde. Getestet wurden alle in den Tabellen 5-9 aufgeführten Substanzen in den dort ebenfalls aufgeführten Konzentrationen.

3.2.3.1.2 Ergebnisse

Bezüglich **Beta-laktam-Antibiotika** wiesen kommerzielle Hemmstofftests eine hohe Sensitivität gegenüber Penicillinen auf, einige Cephalosporine hingegen waren erst in Konzentrationen oberhalb der entsprechenden MRL-Werte nachweisbar. Die Metaboliten Desfuroylceftiofur und Benzylpenicilloylsäure sowie die Clavulansäure wurden in den eingesetzten Konzentrationen nicht erfasst, wohingegen Penethamat auf MRL-Niveau detektierbar war. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Abgesehen vom BRT Hemmstofftest, welcher keines der getesteten **Sulfonamide** auf MRL-Niveau erfasste, zeigten die übrigen mikrobiologischen Testsysteme für die meisten getesteten Sulfonamide ausreichende Empfindlichkeit, die häufig sogar weit unterhalb des MRL-Wertes lag. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 6.

Die Sensitivität gegenüber **Tetracyclinen** war hinsichtlich der festgelegten MRL-Werte unzureichend. Die Nachweisgrenzen lagen um ein Vielfaches höher als die vorgeschriebenen MRL-Werte. Einzig mit dem Delvotest SP war es möglich, die wichtigsten Substanzen zu erfassen. Die ebenfalls mit einem MRL-Wert belegten Epimere waren jedoch auch mit diesem Testsystem nicht nachweisbar. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse zusammen.

Der modifizierte Agardiffusionstest mit *E. coli* konnte elf von 15 überprüften **Chinolone** nachweisen, davon vier der fünf mit einem MRL-Wert belegten Substanzen unterhalb des MRL-Niveaus. Die üblichen mikrobiologischen Hemmstofftests wiesen die geforderte Empfindlichkeit zum Nachweis von Chinolonen auf MRL-Niveau nicht auf. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse im Detail.

Die Nachweisbarkeit von **Aminoglykosiden und Makroliden** auf MRL-Niveau war mittels mikrobiologischen Hemmstofftestsystemen nur eingeschränkt möglich. Einzig mit den Testsystemen BRT MRL-Suchtest und BRT Hemmstofftest war es möglich, zumindest drei der neun überprüften Substanzen auf oder unterhalb des MRL-Wertes zu erfassen. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Hemmstofftests bezüglich Aminoglykosiden und Makroliden zeigt Tabelle 9.

Tabelle 5: Vergleich der Empfindlichkeit verschiedener mikrobiologischer Hemmstofftestsysteme gegenüber **Beta-Laktam-Antibiotika** (ng/ml)

Substanz	**MRL-Wert** [1]	**Prüfbereich**	**BRT MRL**	**BRT Hemm.**	**Delvotest SP**	**AS Brilliant**	**AS Spezial**
Penicillin G	4	2-4	2	2-3	2	4	2
Ampicillin	4	1-6	3-4	4	4	4	2
Amoxicillin	4	1-6	2-3	4	4	4	2
Penethamat	4	1-8	3	4	4	4	2-4
Cloxacillin	30	10-60	20	40	30	60	15
Dicloxacillin	30	5-60	10	15-20	15	60	10
Oxacillin	30	5-30	10	15	15	30	5-10
Nafcillin	30	5-30	10	15	10-15	15	5-10
Clavulansäure	200	10-1000	n. d.	> 1000	> 1000	> 1000	n. d.
Cephapirin	60	1-30	2	3-5	5	5	5
Ceftiofur	100	50-500	100	100-150	100	50	50
Desfuroylceftiofur	100	50-500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Cefquinom	20	50-600	300-500	300-500	200	50-100	100-200
Cefazolin	50	5-50	10-25	15-25	10-20	5-10	10-20
Cefalexin	100	25-800	200	300-400	50-100	50	100-200
Cefoperazon	50	25-50	40	30-50	50	50	25-50
Cefalonium	20	5-40	15-20	20-25	20	10	10-20
Cefacetril	125	5-250	20	30	20	10-20	20
Cefadroxil	kein MRL	5-200	100-200	200	50	5-10	50-100
Cefotaxime	kein MRL	50-400	300-400	200-300	100	100	50-100
Piperacillin	kein MRL	5-200	30	30-40	40-50	100	30
BPO	kein MRL	125-1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh.1); Stand 2005

Tabelle 6: Vergleich der Empfindlichkeit verschiedener mikrobiologischer Hemmstofftestsysteme gegenüber **Sulfonamiden** (ng/ml)

Substanz	**MRL-Wert**[1]	**Prüfbereich**	**BRT MRL**	**BRT Hemm.**	**Delvotest SP**	**AS Brilliant**	**AS Spezial**
Sulfamethazin	100	50-400	100-200	400	100	200	200
Sulfadimethoxin	100	50-400	50-100	400	100	50-100	100
Sulfadiazin	100	50-400	50-100	400	50-100	50-100	100-200
Sulfathiazol	100	50-400	50-100	400	100	50-100	100
SMOP	100	50-200	50-100	400	100-200	100-200	200
Sulfameter	100	50-200	100	> 200	100	100-200	100
Sulfapyridin	100	50-200	100	> 200	100	100-200	100
Sulfamethizol	100	50-400	200-400	400	50-100	50	100
Sulfabenzamid	100	50-400	200-400	200	50-100	100	100
Sulfaquinoxalin	100	50-400	50-100	400	50	50	100
Sulfisoxazol	100	50-400	50-100	400	50	50	100
Trimethoprim	100	50-400	200	400	200	> 200	200
PABA	100	50-200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh.1); Stand 2005

Tabelle 7: Vergleich der Empfindlichkeit verschiedener mikrobiologischer Hemmstofftestsysteme gegenüber **Tetracyclinen** (ng/ml)

Substanz	**MRL-Wert**[1]	**Prüfbereich**	**BRT MRL**	**BRT Hemm.**	**Delvotest SP**	**AS Brilliant**	**AS Spezial**
Tetracyclin	100	50-800	400-800	400-800	100-200	400	200-400
Epimer (Tetrac.)	100	50-200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Oxytetracyclin	100	50-800	400-800	400-800	100-200	400	200-400
Epimer (Oxytetrac.)	100	50-200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Chlortetracyclin	100	50-800	400-800	400-800	200-400	400	200-400
Epimer (Chlortetrac.)	100	50-200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Doxycyclin	kein MRL	50-800	200-400	200-400	100	200-400	200
Rolitetracyclin	kein MRL	50-200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Demeclocyclin	kein MRL	50-200	> 200	> 200	200	> 200	> 200

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh.1); Stand 2005

Tabelle 8: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für **Chinolone** (ng/ml) in mikrobiologischen Hemmstofftests bei visueller und für den Charm ROSA Test bei instrumenteller Auswertung

Substanz	MRL-Wert[1]	BRT MRL	BRT Hemm.	Delvotest SP	mod. Agardiffusions-test mit *E. coli*[2]	Charm ROSA Enroflox Test[3]
Ciprofloxacin	100	1000-2000	1000-2000	2000	1,5	3000
Enrofloxacin	100	2000-3000	1000-2000	3000	5	6
Danofloxacin	30	2000-3000	2000-3000	2000-3000	5	> 1000
Flumequin	50	> 5000	> 5000	> 5000	100-250	> 1000
Marbofloxacin	75	3000-4000	2000-3000	3000-4000	7,5	1000
Chinolinsäure	kein MRL	> 5000	> 5000	> 5000	> 500	> 1000
Difloxacin	kein MRL	4000-5000	3000-4000	5000	200	> 1000
Levofloxacin	kein MRL	2000-3000	2000-3000	1000-2000	15	800
Lomefloxacin	kein MRL	> 5000	4000-5000	3000-4000	n.d.	> 1000
Nalidixinsäure	kein MRL	> 5000	> 5000	> 5000	> 500	> 1000
Norfloxacin	kein MRL	3000-4000	2000-3000	3000-4000	50	> 1000
Ofloxacin	kein MRL	2000-3000	2000-3000	3000-4000	< 50	400
Oxolinsäure	kein MRL	> 5000	> 5000	> 5000	n.d.	> 1000
Sarafloxacin	kein MRL	3000-4000	2000-3000	3000-4000	50	> 1000
Sparfloxacin	kein MRL	2000-3000	2000-3000	3000-4000	15	> 1000

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh.1); Stand 2005
[2] Konzentration, bei der noch ein Hemmhof sichtbar war
[3] Konzentration, bei der mind. 2 von 3 der durchgeführten Tests positiv waren

Tabelle 9: Vergleich der mittels mikrobiologischer Testsysteme ermittelten Nachweisgrenzen für **Aminoglycoside und Makrolide** (ng/ml) mit den Ergebnissen der Messungen mittels Immunomaten; die von EIBERLE (2004) ermittelte Testsensitivität des Immunomaten stehen in Klammern hinter den Werten aus eigenen Untersuchungen

Substanz	**MRL- Wert**[1]	**BRT MRL**	**BRT Hemm.**	**Delvotest SP**	**AS Brilliant**	**AS Spezial**	**Immunomat**[2]
Streptomycin	200	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	2000	400 [59,5]
Neomycin	1500	500	500	500	1000	1000	750 [85,5]
Gentamicin	100	200	200	> 200	> 200	> 200	200 [13,7]
Dihydrostreptomycin	200	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	200[3]
Kanamycin	150	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	> 300
Spectinomycin	200	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	> 400
Erythromycin	40	40	40	> 80	> 80	80	40 [3,87]
Spiramycin	200	400	400	> 400	> 400	> 400	400[4]
Tylosin	50	50	50	50	50	50	> 100

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh.1); Stand 2005
[2] überprüft wurden folgende Konzentrationen: 2 x MRL, MRL, ½ x MRL
[3] im Streptomycin-Nachweis
[4] im Erythromycin-Nachweis

3.2.3.2 Schnelltestsysteme

3.2.3.2.1 Durchführung

Die Testdurchführung und Auswertung erfolgten wie in 3.2.1.2 beschrieben. Probenmaterial war hemmstofffreie Rohmilch, welche mit den Zielsubstanzen in den entsprechenden Konzentrationen künstlich kontaminiert wurde. Getestet wurden alle in Tabelle 9 (Ergebnisse des Immunomaten für Aminoglykoside/Makrolide) bzw. in den Tabellen 12 bis 17 aufgeführten Substanzen in den dort ebenfalls aufgeführten Konzentrationen.

Für das Charm II-Testsystem wurden anhand von Verdünnungsreihen für einige Antibiotika und Sulfonamide Standardkurven erstellt, die eine Quantifizierung der Ergebnisse ermöglichen sollten. Für jede Kurve wurden fünf Wiederholungsmessungen mit je sechs Standardkonzentrationen sowie einem Leerwert (hemmstofffreie Rohmilch) durchgeführt. Aus den ermittelten Werten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient errechnet. Zudem wurden die Messdaten in % des entsprechenden Negativwertes (100 %) umgerechnet (Probe/Negativkontrolle x 100) und mittels Sigma Plot Standardkurven erstellt. Nach Erstellung der Kurven wurden mit Hilfe desselben Programms Kurvendiskussionen durchgeführt und die Nachweisgrenzen bestimmt. Anhand dieser Kurven konnten schließlich zum einen die Nachweisgrenzen sowie die Kreuzreaktionen mit strukturverwandten Analoga in % bestimmt werden.

Zur Berechnung der Kreuzreaktivität wurde folgende Formel herangezogen:

EC 50 (Referenzsubstanz) / EC 50 (Testsubstanz) x 100 = relative Kreuzreaktivität in %

Die Auswertung erfolgte quantitativ anhand der erstellten Standardkurven, wobei - vergleichbar der Auswertung von ELISA-Tests - jeweils der 80 %-Wert zur Bestimmung der Nachweisgrenze herangezogen wurde. Die Auswertung über den Kontrollpunkt wurde vernachlässigt. Für alle überprüften Substanzen, für die keine Standardkurven erstellt wurden, wurden die Nachweisgrenzen jedoch über den Vergleich mit dem entsprechenden Kontrollpunkt bestimmt. Als Nachweisgrenze wurde jeweils die Konzentration, bei der mindestens zwei von drei durchgeführten Tests positiv waren, festgelegt.

3.2.3.2.2 Ergebnisse

Beta-laktam-Antibiotika

Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Schnelltestsysteme ergab, dass der Charm II, der Charm ROSA und der Parallux viele der relevanten Beta-laktam-Antibiotika auf MRL-Niveau, meist sogar darunter, erfassten. Mit dem Parallux wurden einige Cephalosporine in den eingesetzten Konzentrationen nicht erfasst. Der Metabolit Desfuroylceftiofur wurde von allen Systemen erfasst, Benzylpenicillinoylsäure (BPO) als Metabolit von Penicillin G in den eingesetzten Konzentrationen nur vom Parallux-System. Clavulansäure war nur mittels Charm II und Charm ROSA System beim doppelten MRL-Wert nachweisbar. Die Messungen mit dem Immunomaten zeigten, dass nur zehn der 22 getesteten Beta-laktame erfasst wurden, davon fünf auf oder unterhalb MRL-Niveau. Die Metaboliten Desfuroylceftiofur und Benzylpenicilloylsäure (BPO) wurden beide erfasst, die Tests mit Clavulansäure ergaben negative Resultate. Die Ergebnisse des Charm ROSA und des Parallux stimmten, von wenigen Ausnahmen abgesehen, weitgehend mit den Herstellerangaben überein. Die mittels Charm II erstellten Nachweisgrenzen für Penicillin G, Amoxicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Cephapirin und Ceftiofur lagen teilweise weit unterhalb, für Penethamat, Nafcillin und Piperacillin weit oberhalb der Herstellerangaben. Die mit dem Immunomat ermittelten Nachweisgrenzen für Cloxacillin und Cephapirin lagen über den in anderen Arbeiten ermittelten Grenzen. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst.

Mittels Charm II-Testsystem wurden Standardkurven in Rohmilch für Penicillin G, Cloxacillin, Dicloxacillin, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Nafcillin, Cephapirin, Ceftiofur, Cefquinom und Cefazolin erstellt. In Abbildung 8 findet sich exemplarisch eine Standardkurve für Penicillin G, anhand der die Kreuzreaktionen für weitere Beta-laktam-Antibiotika berechnet wurden (siehe Tabelle 10). Die Koeffizienten sowohl der Intra- als auch der Interassay-Variationen lagen für sämtliche Kurven < 10 %.

Tabelle 10: Kreuzreaktionen der mittels Charm II getesteten Beta-laktam-Antibiotika (Referenzantibiotikum ist Penicillin G), sowie die 50 und 80 %-Werte für die einzelnen Substanzen

	EC 50 (ng/ml)	EC 80 (ng/ml)	Kreuzreaktivität in %
Penicillin G	1,99	0,75	100
Cloxacillin	36,19	7,57	5,5
Dicloxacillin	26,97	5,04	7,38
Oxacillin	159,89	33,37	1,24
Nafcillin	289,25	62,08	0,68
Ampicillin	15,43	3,92	12,89
Amoxicillin	8,58	1,01	23,19
Cephapirin	3,62	1,23	54,97
Ceftiofur	15,26	nicht ablesbar	13,04
Cefquinom	100,90	24,80	1,97
Cefazolin	30,17	11,54	6,60

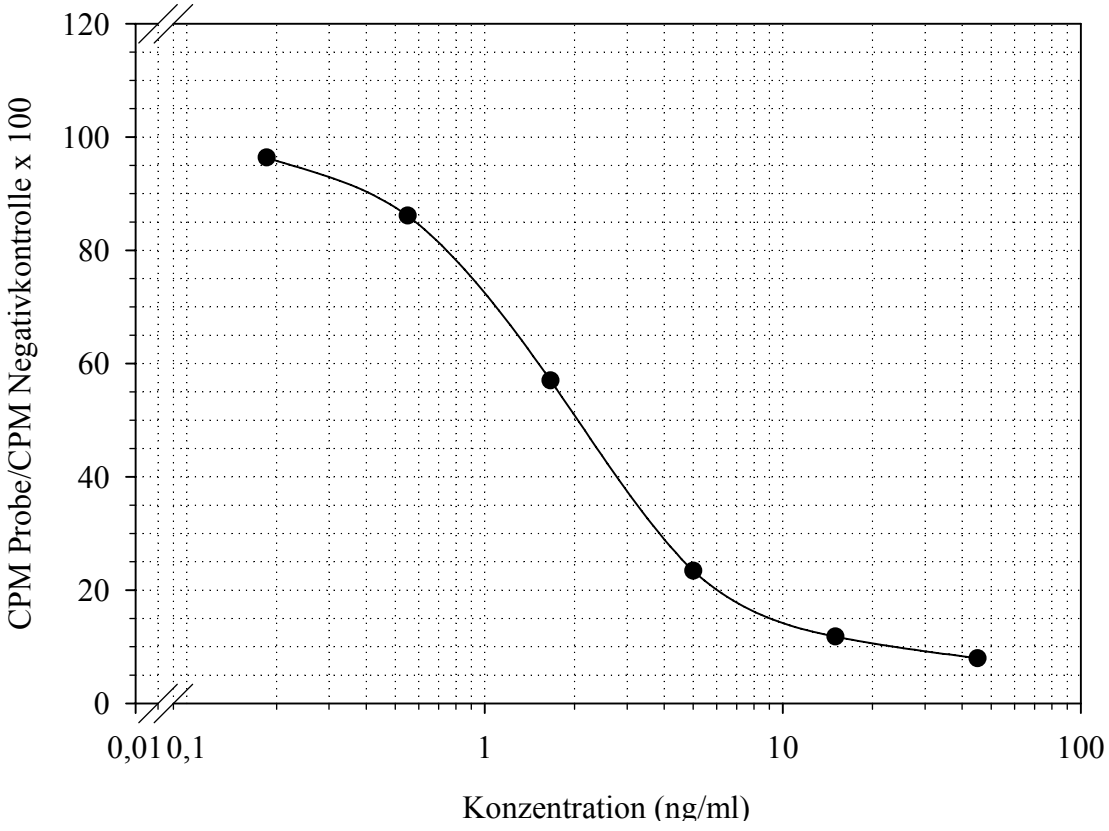


Abbildung 8: Standardkurve für Penicillin G in Rohmilch mittels Charm II

Sulfonamide

Die überprüften Sulfonamide wurden von allen Testsystemen in ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen. Mit dem Charm II wurden zehn von 12 untersuchten Sulfonamiden auf oder unterhalb des MRL-Wertes nachgewiesen. Trimethoprim war in den eingesetzten Konzentrationen nicht nachweisbar. Das Charm ROSA Testsystem erwies sich als sehr spezifisch und erfasste nur zwei der untersuchten Sulfonamide. Mit dem Parallux-System waren nur fünf der untersuchten Sulfonamide nachweisbar. Trimethoprim wurde von keinem der beiden Systeme detektiert, p-Aminobenzoesäure (PABA) konnte nur mittels Charm II nachgewiesen werden. Die Messungen mit dem Immunomaten ergaben eine Nachweisbarkeit von sieben der 12 Sulfonamide, davon jedoch nur vier auf MRL-Niveau. Trimethoprim konnte beim doppelten MRL-Wert nachgewiesen werden, p-Aminobenzoesäure war in den überprüften Konzentrationen nicht detektierbar. Die mittels Charm II erstellten Nachweisgrenzen für Sulfamethazin, Sulfadimethoxin, Sulfadiazin und Sulfathiazol lagen weit unterhalb der entsprechenden Herstellerangaben. Die mittels Charm ROSA erstellten Nachweisgrenzen für Sulfamethazin und Sulfadimethoxin lagen ebenfalls weit unterhalb der entsprechenden Herstellerangaben, ebenso wie die Nachweisgrenzen des Immunomaten für Sulfamethazin und Sulfadiazin. Mittels Parallux konnte die Herstellerangabe für Sulfadiazin nicht eingehalten werden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst.

Zur Erstellung der Standardkurven für diverse Sulfonamide in Rohmilch mittels Charm II wurden die mit den Testkonzentrationen dotierten Rohmilchproben gemäß den Herstellerangaben nochmals 1:10 mit hemmstofffreier Rohmilch verdünnt. Es wurden Kurven für Sulfamethazin, Sulfadimethoxin, Sulfadiazin und Sulfathiazol erstellt und die Kreuzreaktionen anhand der unter 3.2.3.2.1 angegebenen Formel berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch eine Standardkurve für Sulfamethazin, anhand der die Kreuzreaktionen für weitere Sulfonamide berechnet wurden. Die Koeffizienten sowohl der Intra- als auch der Interassay-Variationen lagen für sämtliche Kurven < 10 %.

Tabelle 11 : Kreuzreaktivität der mittels Charm II getesteten Sulfonamide (bezogen auf Sulfamethazin), sowie die 50 und 80 %-Werte für die einzelnen Substanzen.

	EC 50 (ng/ml)	EC 80 (ng/ml)	Kreuzreaktivität in %
Sulfamethazin	54,24	17,78	100
Sulfadimethoxin	19,10	6,04	283,97
Sulfadiazin	26,41	8,35	205,37
Sulfathiazol	51,79	19,45	104,73

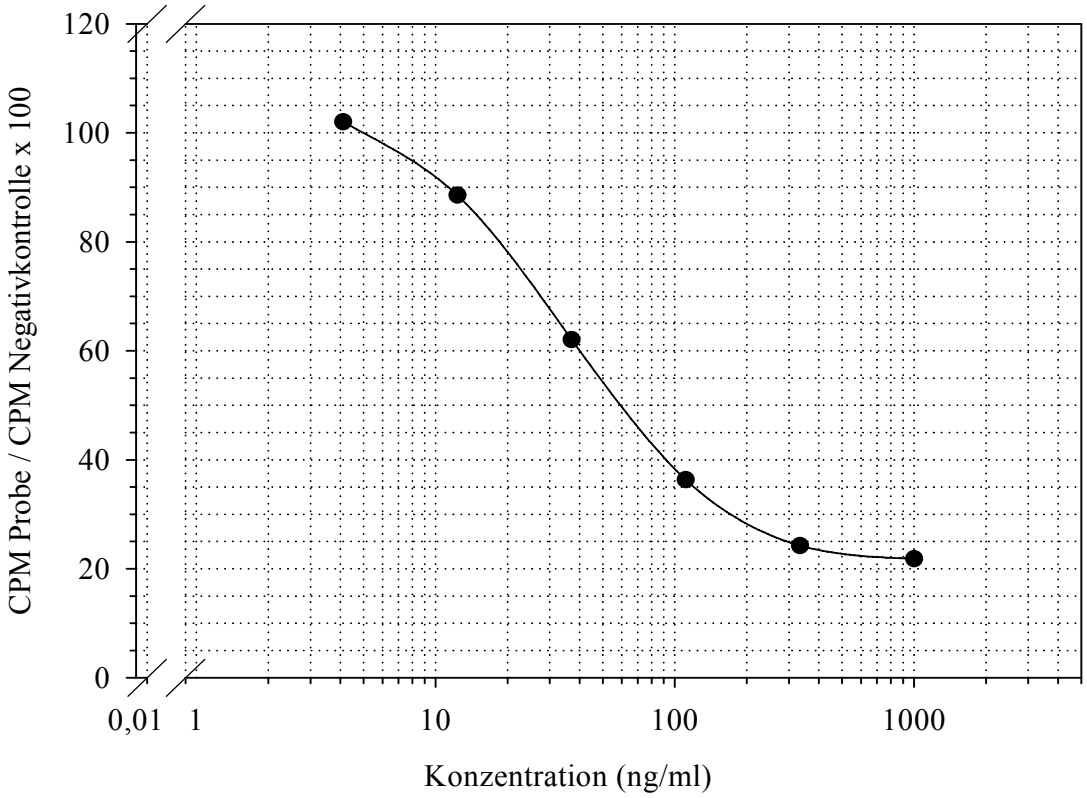


Abbildung 9: Standardkurve für Sulfamethazin in Rohmilch mittels Charm II

Tetracycline

Mit den Testsystemen Charm II, Charm ROSA und Parallux konnten alle der mit einem MRL-Wert belegten Tetracycline auf bzw. unterhalb des MRL-Wertes nachgewiesen werden. Zudem waren sie in der Lage, Rolitetracyclin und Demeclocyclin nachzuweisen, welche nicht mit einem MRL-Wert belegt sind. Von den getesteten epimeren Formen von Tetra-, Oxy- und Chlortetracyclin war nur das Epimer von Tetracyclin mittels Charm II und Parallux auf dem einfachen bzw. doppelten MRL-Wert nachweisbar. Die mittels Charm II und Parallux erstellten Nachweisgrenzen für wichtige Tetracycline wichen teils stark von den

Herstellerangaben ab. Die Nachweisgrenze für Doxycyclin beim Charm ROSA-Testsystem lag weit über der Herstellerangabe. Die genauen Ergebnisse zeigen Tabelle 16 und 17.

Es wurden Standardkurven für Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin mittels Charm II erstellt. Gemäß Herstellerangaben wurden die mit den Testkonzentrationen dotierten Rohmilchproben für diesen Nachweis 1:3 mit hemmstofffreier Rohmilch verdünnt. Die erstellten Kurven waren jedoch wegen des hohen Backgrounds des Tetracyclin-Nachweises sowie des nicht-sigmoidalen Kurvenverlaufes nicht nach den üblichen Parametern für Standardkurven auswertbar. Auch die Reproduzierbarkeit war ungenügend, die Intra- und Interassay-Werte lagen durchweg deutlich über zehn, teils sogar über 20 %. Da eine Berechnung der Kreuzreaktionen anhand der 50 %-Werte sowie die Ermittlung der Sensitivität anhand der 80 %-Werte nicht möglich waren, wurde zur Bestimmung der Nachweisgrenzen die Auswertung mittels Kontrollpunkt-Vergleich herangezogen. Das heißt, für alle mittels Charm II überprüften Tetracycline wurde die Konzentration als Nachweisgrenze festgelegt, bei der mindestens zwei von drei durchgeführten Tests positiv waren. Abbildung 10 zeigt exemplarisch eine Standardkurve für Tetracyclin.

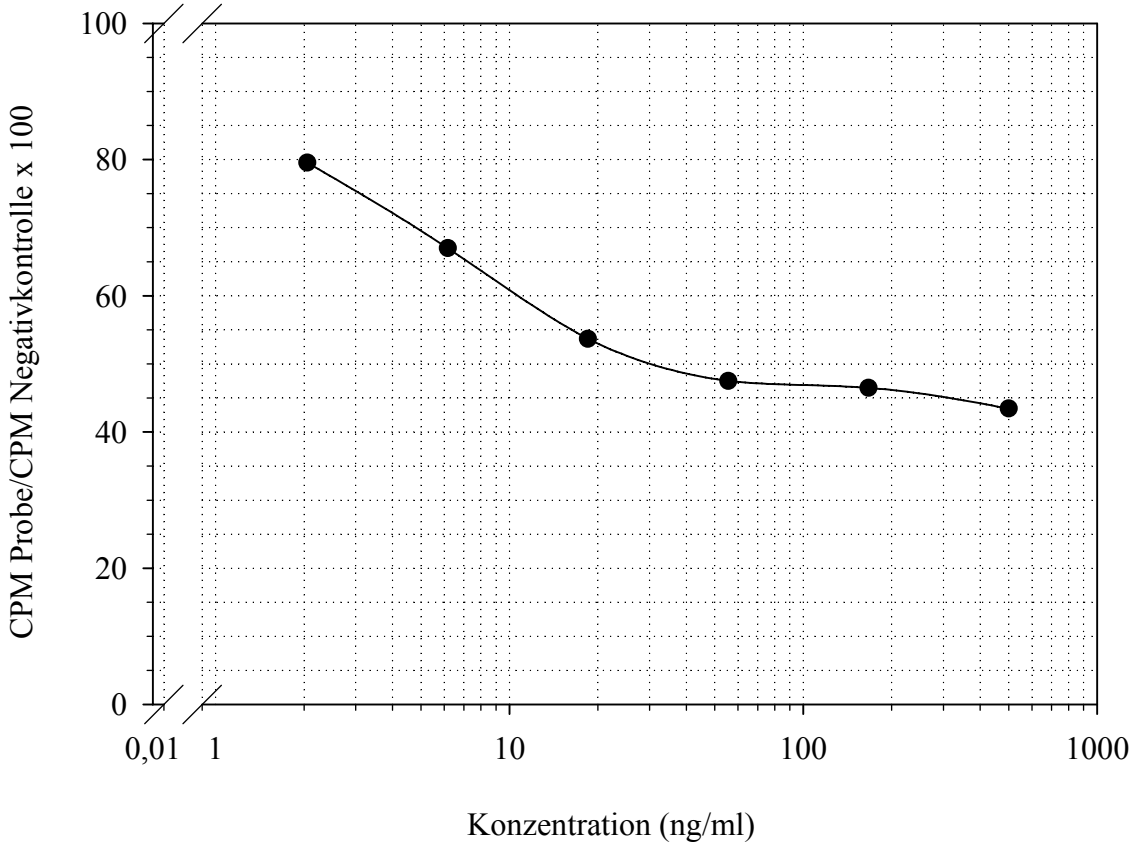


Abbildung 10: Standardkurve für Tetracyclin in Rohmilch mittels Charm II

Tabelle 12: Vergleich der instrumentell ermittelten Nachweisgrenzen der verschiedenen Testsysteme für **Beta-laktam-Antibiotika** (ng/ml)

	Charm II		**Charm ROSA**		**Parallux**		**Immunomat**	
Substanz	untersuchte Konz.[1]	positive Konz.[2]	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]
Penicillin G	0,185-45,0*	0,75	3/2/1	1	4/2/1	2	40/4	40[5]
Ampicillin	0,55-135,0*	3,92	4/3/2	3	8/5/2	5	40/4	> 40
Amoxicillin	0,185-45,0*	1,01	4/3	4	7/6/4	7	40/4	> 40
Penethamat	16/8/4	16	50/25/10/5	10	8/4	> 8	40/4	> 40
Cloxacillin	1,85-450,0*	7,57	35/20/10	20	8/5/2	5[4] bzw. 8[5]	30/15	30[4]
Dicloxacillin	1,85-450,0*	5,04	30/20/10	30	10/5	10[4]	30/15	15[4]
Oxacillin	1,85-450,0*	33,37	60/50/40/25	60	30/25/10/5	10[5] bzw. 25[4]	60/30	> 60
Nafcillin	1,85-450,0*	62,08	70/60/50/30	70	15/10/5	15	60/30	> 60
Clavulansäure	400/200	400	400/200	400	400/200	> 400	200	> 200
Cephapirin	0,185-45,0*	1,23	10/5/2	5	16/10/5	10	60/30	30[6]
Ceftiofur	1,85-450,0	1-2	100/50/25/10/5	10	35/30/20	30	100/50	100[5]
Desfuroylceftiofur	40/20	20	50/10	10	100/50	100	200/100	200[5]
Cefquinom	1,85-450,0*	24,80	20/15/10	15	40/30/20	40	40/20	20[6]
Cefazolin	0,185-45,0*	11,54	20/10/5	10	100/50	> 100	100/50	> 100
Cefoperazon	50/25	25	50/25	25	100/50	> 100	100/50	100[6]

Fortsetzung Tabelle 12:

Vergleich der instrumentell ermittelten Nachweisgrenzen der verschiedenen Testsysteme für **Beta-laktam-Antibiotika** (ng/ml)

	Charm II		**Charm ROSA**		**Parallux**		**Immunomat**	
Substanz	untersuchte Konz.[1]	positive Konz.[2]	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]
Cefalexin	15/10	15	100/50	50	200/100	> 200	200/100	200[6]
Cefalonium	20/10	10	4/2	4	40/20	> 40	40/20	> 40
Cefacetril	125/62,5	62,5	125/62,5	62,5	250/125	> 250	125	125[6]
Cefadroxil	15/10	15	100/50	50	200/100	> 200	200/100	> 200
Cefotaxime	4/2	4	100/50	50	100/50	50[7]	200/100	> 200
Piperacillin	15/8/4	> 15	50/25	25	50/25	25[5]	50	> 50
BPO	8/4	> 8	8/4	> 8	900/700/600/ 550/500	550	1000	1000[5]

[1] bei den markierten (*) Substanzen wurden aus Verdünnungsreihen Standardkurven angelegt
[2] zur Bestimmung der Nachweisgrenze der mit (*) markierten Substanzen wurde der 80 %-Wert der Standardkurve herangezogen, ansonsten siehe ([3])
[3] Konzentration, bei der mind. 2 von 3 durchgeführten Tests positiv waren
[4] im Cloxacillin-Nachweis
[5] im Penicillin-Nachweis
[6] im Cephapirin-Nachweis
[7] im Ceftiofur-Nachweis

Tabelle 13: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für **Beta-laktam-Antibiotika** (ng/ml) mit den entsprechenden Herstellerangaben; Angaben für den Immunomaten entnommen aus EIBERLE (2004)

		Charm II		**Charm ROSA**		**Parallux**		**Immunomat**	
Substanz	MRL-Wert[1]	angegebene Testsens.[2]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[3]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[4]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.	ermittelte Testsens.
Penicillin G	4	2	0,75	2-3	1	4	2[5]	k. A.	40[5]
Ampicillin	4	4	3,92	3-4	3	8	5	k. A.	> 40
Amoxicillin	4	5	1,01	3-4	4	6	7	k. A.	> 40
Penethamat	4	2	16	k. A.	10	k. A.	> 8	k. A.	> 40
Cloxacillin	30	30	7,57	20-30	20	8[6] bzw. 15[5]	5[6] bzw. 8[5]	3,56	30[6]
Dicloxacillin	30	20	5,04	15-30	30	10	10[6]	k. A.	15[6]
Oxacillin	30	30	33,37	25-40	60	15	10[5] bzw. 25[6]	k. A.	> 60
Nafcillin	30	30	62,08	30-50	70	15	15	k. A.	> 60
Clavulansäure	200	k. A.	400	k. A.	400	k. A.	> 400	k. A.	> 200
Cephapirin	60	3	1,23	5-10	5	16	10	1,80	> 200
Ceftiofur	100	40	1-2	50-100	10	35	30	k. A.	30[5]
Desfuroylceftiofur	100	40	20	k. A.	10	k. A.	100	k. A.	200[5]
Cefquinom	20	20	24,80	15-20	15	k. A.	40	k. A.	20[7]
Cefazolin	50	15	11,54	10-20	10	k. A.	> 100	k. A.	> 100
Cefoperazon	50	k. A.	25	k. A.	25	k. A.	> 100	k. A.	100[7]

Fortsetzung Tabelle 13:

Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für **Beta-laktam-Antibiotika** (ng/ml) mit den entsprechenden Herstellerangaben; Angaben für den Immunomaten entnommen aus EIBERLE (2004)

		Charm II		**Charm ROSA**		**Parallux**		**Immunomat**	
Substanz	MRL-Wert[1]	angegebene Testsens.[2]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[3]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[4]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.	ermittelte Testsens.
Cefalexin	100	15	15	k. A.	50	k. A.	> 200	k. A.	200[7]
Cefalonium	20	k. A.	10	2-4	4	k. A.	> 40	k. A.	> 40
Cefacetril	125	k. A.	62,5	k. A.	62,5	k. A.	> 250	k. A.	125[7]
Cefadroxil	kein MRL	k. A.	15	k. A.	50	k. A.	> 200	k. A.	> 200
Cefotaxime	kein MRL	k. A.	4	k. A.	50	k. A.	50	k. A.	> 200
Piperacillin	kein MRL	8	> 15	k. A.	25	k. A.	25[5]	k. A.	> 50
BPO	kein MRL	k. A.	> 8	k. A.	> 8	k. A.	550	k. A.	1000[5]

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh. 1); Stand 2005
[2] Charm Operators Manual for Milk; Dez. 2000
[3] Charm Operators Manual for Bovine Milk; März 2002
[4] IDEXX Laboratories (1999)
[5] im Penicillin-Nachweis
[6] im Cloxacillin-Nachweis
[7] im Cephapirin-Nachweis

Tabelle 14: Vergleich der instrumentell ermittelten Nachweisgrenzen der verschiedenen Testsysteme für **Sulfonamide** (ng/ml)

	Charm II[1]		**Charm ROSA**		**Parallux**		**Immunomat**	
Substanz	untersuchte Konz.[2]	positive Konz.	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]	untersuchte Konz.	positive Konz.	untersuchte Konz.	positive Konz.
Sulfamethazin	4,11-1000,0*	17,78	6,5/6/5/4	4	15/12/10	12	200/100/50	100[4]
Sulfadimethoxin	4,11-1000,0*	6,04	8,5/8/7/6	7	15/10/5	10	200/100	> 200
Sulfadiazin	4,11-1000,0*	8,35	200/100	> 200	200/100/50	100[5]	200/100	200[6]
Sulfathiazol	4,11-1000,0*	19,45	200/100	> 200	15/12/10	10	200/100	> 200
SMOP	50/25	50	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	> 200
Sulfameter	100/50	50	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	> 200
Sulfamethizol	300/150	> 300	200/100	> 200	200/100	100[5]	200/100	> 200
Sulfabenzamid	100/50	100	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	> 200
Sulfaquinoxalin	30	30	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	> 200
Sulfapyridin	100	100	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	> 200
Sulfisoxazol	120/60	120	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	100 [4/ 6]
PABA	30/15	30	200/100	> 200	100/50	> 100	200/100	> 200
Trimethoprim	100/50	> 100	100/50	> 100	100/50	> 100	200100	200 [4/ 6]

[1] jede Probe wurde nach Herstellerangabe nochmals 1:10 verdünnt, d.h. die tatsächliche Nachweisgrenze beträgt ein Zehntel der angegebenen Nachweisgrenze
[2] bei den mit (*) markierten Substanzen wurden aus Verdünnungsreihen Standardkurven angelegt; die Auswertung erfolgte quantitativ über den 80 %-Wert
[3] Konzentration, bei der mind. 2 von 3 durchgeführten Tests positiv waren
[4] im Sulfamethazin-Nachweis
[5] im Sulfathiazol-Nachweis
[6] im Sulfadiazin-Nachweis

Tabelle 15: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für **Sulfonamide** (ng/ml) mit den entsprechenden Herstellerangaben; Angaben für den Immunomaten entnommen aus EIBERLE (2004)

		Charm II		**Charm ROSA**		**Parallux**		**Immunomat**	
Substanz	MRL-Wert[1]	angegebene Testsens.[2]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[3]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[4]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.	ermittelte Testsens.
Sulfamethazin	100	94	17,78	64	4	12	12	26,4	100[5]
Sulfadimethoxin	100	40	6,04	83	7	10	10	k. A.	> 200
Sulfadiazin	100	49	8,35	k. A.	> 200	12	100[6]	34,5	200[7]
Sulfathiazol	100	73	19,45	k. A.	> 200	k. A.	10	k. A.	> 200
SMOP	100	50	50	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	> 200
Sulfameter	100	k. A.	50	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	> 200
Sulfamethizol	100	150	> 300	k. A.	> 200	k. A.	100[6]	k. A.	> 200
Sulfabenzamid	100	k. A.	100	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	> 200
Sulfaquinoxalin	100	30	30	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	> 200
Sulfapyridin	100	100	100	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	> 200
Sulfisoxazol	100	60	120	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	100 [5/7]
PABA	100	30	30	k. A.	> 200	k. A.	200	k. A.	> 200
Trimethoprim	100	k. A.	> 100	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	200 [5/7]

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh. 1); Stand 2005
[2] Charm Operators Manual for Milk; Juli 2001
[3] Charm Operators Manual for Raw, Commingled Bovine Milk; Dez. 2003
[4] IDEXX Laboratories (1999)
[5] im Sulfamethazin-Nachweis
[6] im Sulfathiazol-Nachweis
[7] im Sulfadiazin-Nachweis

Tabelle 16: Vergleich der instrumentell ermittelten Nachweisgrenzen der verschiedenen Testsysteme für **Tetracycline** (ng/ml)

	Charm II[1]		**Charm ROSA**		**Parallux**	
Substanz	untersuchte Konz.[2]	positive Konz.	untersuchte Konz.	positive Konz.[3]	untersuchte Konz.	positive Konz.[4]
Tetracyclin	2,05-500*	50-60	30/20/15	20	110/90/80/50/30	80
Epimer (Tetracyclin)	200/100	200	200/100	> 200	100/50	100
Oxytetracyclin	6,17-4500*	100-200	100/70/60/50	100	100/60/50/40/20	50
Epimer (Oxytetracyclin)	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	200
Chlortetracyclin	6,17-4500*	50-60	100/70/60/40/20	40	150/125/100/80/70	80
Epimer (Chlortetracyclin)	200/100	> 200	200/100	> 200	200/100	200
Doxycyclin	6,17-4500*	> 500	400/300/200/100/70	300	100/80/50/30	80
Rolitetracyclin	80/40/20	80	100/50	50	200/100	200
Demeclocyclin	300/150	150	200/100	200	200/100	200

[1] Jede Probe wurde (nach Herstellerangaben) nochmals 1:3 verdünnt, d.h., die tatsächliche Nachweisgrenze beträgt ein Drittel der angegebenen Nachweisgrenze
[2] bei den mit (*) markierten Substanzen wurden aus Verdünnungsreihen Standardkurven angelegt
[3] Konzentration, bei der mind. 2 von 3 durchgeführten Tests positiv waren

Tabelle 17: Vergleich der für die einzelnen Testsysteme ermittelten Nachweisgrenzen für **Tetracycline** (ng/ml) mit den entsprechenden Herstellerangaben

		Charm II		**Charm ROSA**		**Parallux**	
Substanz	MRL – Wert[1]	angegebene Testsens.[2]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[3]	ermittelte Testsens.	angegebene Testsens.[4]	ermittelte Testsens.
Tetracyclin	100	20	50-60	15-30	20	100	80
Oxytetracyclin	100	80	100-200	70-100	100	80	50
Chlortetracyclin	100	100	50-60	70-100	40	125	80
Doxycyclin	100	100	> 500	70-100	300	75	80
Epimer (Tetracyclin)	100	k. A.	200	k. A.	> 200	k. A.	100
Epimer (Oxytetracyclin)	100	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	200
Epimer (Chlortetracyclin)	100	k. A.	> 200	k. A.	> 200	k. A.	200
Rolitetracyclin	kein MRL	40	80	k. A.	50	k. A.	200
Demeclocyclin	kein MRL	150	150	k. A.	200	k. A.	200

[1] MRL-Wert für Milch nach VO (EWG) 2377/90 (Anh. 1); Stand 2005
[2] Charm Operators Manual for Milk; Okt. 1998
[3] Charm Operators Manual for Raw Bovine Milk; Aug. 2003
[4] IDEXX Laboratories (1999)

Chinolone, Aminoglykoside und Makrolide

Als einziger Schnelltest ermöglichte der Charm ROSA Test den Nachweis von **Chinolonen**. Es waren von 15 getesteten Substanzen fünf Substanzen nachweisbar, davon jedoch nur Enrofloxacin unterhalb des MRL-Werts (siehe Tabelle 8).

Unter den Schnelltestverfahren war ein Nachweis von **Aminoglykosiden und Makroliden** nur mittels Immunomat möglich, wobei von sechs getesteten Aminoglykosiden vier nachweisbar waren, davon zwei auf bzw. unter MRL-Niveau. Streptomycin und Gentamicin waren erst beim doppelten MRL-Wert, Kanamycin und Spectinomycin in den überprüften Konzentrationen nicht nachweisbar. Von drei getesteten Makroliden waren mittels Immunomat nur zwei nachweisbar, wobei allein Erythomycin auf MRL-Niveau detektierbar war. Spiramycin wurde beim doppelten MRL-Wert nachgewiesen. Auch hier wichen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen von den Ergebnissen aus EIBERLE (2004) ab (siehe Tabelle 9).

3.2.4. Überprüfung des Einflusses der Milchbeschaffenheit auf die Schnelltestsysteme

Die Ergebnisse analytischer Testsysteme sind durch eine große Anzahl von Faktoren beeinflussbar. Hierbei kommt vor allem Veränderungen der Milchbeschaffenheit eine große Bedeutung zu, wobei insbesondere Abweichungen des pH-Werts sowie erhöhte Keim- und Zellzahlen eine wichtige Rolle spielen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Testbedingungen gewählt, die in der Praxis bei Anlieferungsmilch eher selten vorkommen, im Falle von Einzelgemelken oder bei unsachgemäßer Lagerung bzw. Transport von Proben jedoch durchaus möglich sind. Es wurde daher überprüft, inwiefern solche Veränderungen der Milchbeschaffenheit die Funktionalität der Schnelltestsysteme beeinflussen und somit zu falsch-negativen oder falsch-positiven Testergebnissen führen können. Als Probenmaterial diente hemmstofffreie Rohmilch, die zur Herstellung der Positivkontrollen, wie unter 3.2.1.1 beschrieben, künstlich mit Antibiotika bzw. Sulfonamiden auf MRL-Niveau kontaminiert wurde. Da die Testsysteme teilweise unterschiedliche Nachweisspektren besitzen, wurden auch verschiedene Referenzantibiotika als positive Proben eingesetzt. Als Referenzsubstanz für die unspezifischen Beta-laktam-Nachweise von Charm II und Charm ROSA wurde Penicillin G eingesetzt, für den Sulfonamid-Nachweis des Charm II Sulfamethazin und für die Tetracyclin-Nachweise von Charm II und Charm ROSA Tetracyclin. Für die übrigen Nachweise der Testsysteme wurden jeweils die Substanzen verwendet, für die sie hauptsächlich ausgelegt sind.

3.2.4.1 Überprüfung des Einflusses von pH-Wert-Veränderungen auf die Schnelltestsysteme

3.2.4.1.1 Herstellung des Probenmaterials und Durchführung

Als Probenmaterial für die Überprüfung des Einflusses von pH-Wert-Veränderungen auf die Schnelltestsysteme diente hemmstofffreie Rohmilch (pH 6,7). Sie wurde durch Zugabe von Milchsäure (92 %-ig) bzw. Natronlauge (1 mol/l) unter ständiger Kontrolle mittels pH-Meter auf die pH-Werte 5, 6, 7, 8 und 9 eingestellt. Anschließend wurde ein Teil der Proben durch Zugabe der Referenzantibiotika künstlich kontaminiert. Die Durchführung der Schnelltests erfolgte wie unter 3.2.1.2. beschrieben. Es wurden jeweils drei Untersuchungen für die positiven und die negativen Proben auf jedem pH-Niveau durchgeführt, mittels Immunomat wurden eine positive und eine negative Probe pro pH-Wert gemessen.

3.2.4.1.2 Ergebnisse

Die **Beta-laktam-Nachweise** aller vier Schnelltestsysteme arbeiteten im neutralen pH-Bereich (pH 6-7) zuverlässig, es traten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse auf. Auch im leicht-basischen Bereich (pH 8) wurden bei Messung mittels Charm II-Testsystem und Immunomat keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse beobachtet, der Charm ROSA Test hingegen zeigte ein falsch-positives Resultat. Das Parallux Testsystem erbrachte bei drei durchgeführten Messungen ein falsch-positives Ergebnis im Pen G-Nachweis, die übrigen drei Nachweise erkannten alle Proben richtig. Alle Testsysteme wurden durch stark saure (pH 5) und stark basische Bedingungen (pH 9) gestört, wobei das Charm II-Testsystem bei einem pH-Wert von 5 deutlich zu falsch-positiven, bei einem pH-Wert von 9 zu falsch-negativen Ergebnissen neigte. Das Charm ROSA Testsystem zeigte sowohl bei pH 5 als auch bei pH 9 falsch-positive Ergebnisse. Innerhalb des Parallux Testsystems wiesen mit Ausnahme des Ceftiofur-Nachweises alle Nachweise eine Störanfälligkeit gegenüber stark saurem pH-Wert (pH 5) auf, wohingegen ein stark basischer Bereich (pH 9) nur den Pen G-Nachweis und den Cephapirin-Nachweis störte. Beide wiesen in diesem pH-Wert-Bereich falsch-positive Ergebnisse auf. Messungen mittels Immunomat wurden bei pH 5 nicht durchgeführt, um die Funktionalität des empfindlichen Schlauchsystems dieses Prototyps durch die veränderte Milchkonsistenz nicht zu gefährden. Messungen bei pH 9 wurden zwar durchgeführt, waren jedoch aufgrund der starken Schlierenbildung weder visuell noch instrumentell auswertbar.

Die Nachweise für **Sulfonamide** von Charm II, Charm ROSA und Immunomat erzielten bei neutralem pH-Wert (6-7) zuverlässige Messergebnisse, mit dem Parallux-System wurde bei pH 6 einmalig ein falsch-positives Ergebnis im Sulfathiazol-Nachweis gemessen. Alle Systeme, mit Ausnahme des Immunomaten, zeigten im leicht basischen Bereich (pH 8) eine Beeinträchtigung der Nachweissicherheit. Mit dem Charm II wurde ein falsch-negatives Ergebnis erzielt, während Charm ROSA sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse erbrachte. Für das Parallux-System wurden falsch-positive Ergebnisse im Sulfadimethoxin- und Sulfamethazin-Nachweis festgestellt. Messungen bei einem stark basischen pH-Wert (pH 9) ergaben ein falsch-negatives Ergebnis aus drei mittels Charm II durchgeführten Messungen. Die mit dem Charm ROSA System erzielten Ergebnisse waren wegen starker Schlierenbildung des Farbstoffes und mangelhafter Ausbildung der Kontroll- und Testlinien weder visuell noch instrumentell auswertbar. Das Parallux-System erwies sich als sehr störanfällig bei erhöhtem pH-Wert. So wurden im Sulfadimethoxin- und im Sulfamethazin-Nachweis falsch-positive, im Sulfathiazol-Nachweis falsch-negative Ergebnisse erzielt. Die Messungen mittels Immunomat waren nicht auswertbar. Ein stark saures Milieu (pH 5) beeinträchtigte wiederum sämtliche Testsysteme, wobei die Testsysteme Charm II und Parallux sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse erzielten und der Charm ROSA Test aufgrund mangelhafter Ausbildung der Kontrolllinie nicht auswertbar war. Von einer Messung mittels Immunomat wurde bei diesem pH-Wert aus bereits oben genannten Gründen abgesehen.

Messungen mittels **Tetracyclin-Nachweis** des Charm ROSA bei neutralem pH-Wert (6-7) ergaben keine veränderten Testergebnisse, mittels Charm II und Parallux hingegen wurden falsch-negative Ergebnisse erzielt. Leicht basische pH-Veränderungen (pH 8) führten beim Charm II zu einem falsch-positiven Ergebnis aus drei durchgeführten Messungen, beim Charm ROSA traten sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse auf. Das Parallux-System funktionierte zuverlässig. Stark basische pH-Veränderungen (pH 9) ergaben falsch-positive Testergebnisse für Charm II und Parallux. Die Messungen mit dem Charm ROSA waren visuell aufgrund der sehr undeutlichen Ausbildung der Kontroll- und Testlinien nicht auswertbar, mittels Reader hingegen wurden zwei von drei positiven Proben richtig erkannt. Die Ergebnisse des Charm II- und des Charm ROSA Testsystems waren bei einem stark sauren pH-Wert von 5 aufgrund der starken Veränderung der Milchbeschaffenheit nicht auswertbar. Die Ergebnisse des Parallux-Systems hingegen waren zuverlässig, es traten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse auf.

Der Charm ROSA Enrofloxacin-Test zum Nachweis von **Chinolonen** funktionierte bei pH 6 und 7 zuverlässig, bei pH 8 und 9 wurde jeweils ein falsch-negatives Ergebnis aus drei durchgeführten Messungen erzielt. Stark saure pH-Veränderungen (pH 5) führten zu einer starken Schlierenbildung des Farbstoffes auf den Teststreifen, so dass diese visuell nicht auswertbar waren. Instrumentell jedoch wurden alle mit Enrofloxacin dotierten Milchproben erkannt, die Messungen der negativen Rohmilchproben führten zu einem falsch-positiven Ergebnis.

Die Nachweise von **Aminoglykosiden und Makroliden** mittels Immunomat waren bei pH 6-8 zuverlässig, bei pH 9 jedoch wiederum nicht auswertbar (siehe oben). Von einer Messung bei pH 5 wurde aus oben genannten Gründen abgesehen. Eine Zusammenfassung der Messergebnisse findet sich in Tabelle 18.

Tabelle 18: Überprüfung des Einflusses verschiedener pH-Werte auf die Testergebnisse bei instrumenteller Auswertung (je zwei bzw. drei Testansätze für negative und mit Antiinfektiva dotierte Milchproben; Immunomat je ein Ansatz)

Substanzen und Testsysteme		**pH 5**		**pH 6**		**pH 7**		**pH 8**		**pH 9**	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Beta-laktame											
Charm II		3 (3)	1 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)
ROSA		3 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	0 (3)
Parallux	Cloxacillin	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
	Penicillin G	1 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)
	Cephapirin	2 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)
	Ceftiofur	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)
Immunomat		n. d.	n. d.	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	nicht auswertbar	
Sulfonamide											
Charm II		2 (3)	1 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)
ROSA		nicht auswertbar		3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	1 (3)	2 (3)	nicht auswertbar	
Parallux	Sulfadimethoxin	0 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	1 (3)
	Sulfathiazol	1 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)
	Sulfamethazin	1 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	0 (3)
Immunomat		n. d.	n. d.	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	nicht auswertbar	

Fortsetzung Tabelle 18: Überprüfung des Einflusses verschiedener pH-Werte auf die Testergebnisse bei instrumenteller Auswertung (je zwei bzw. drei Testansätze für negative und mit Antiinfektiva dotierte Milchproben; Immunomat je ein Ansatz)

Substanzen und Testsysteme	**pH 5**		**pH 6**		**pH 7**		**pH 8**		**pH 9**	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Tetracycline										
Charm II	nicht auswertbar		1 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	2 (3)
ROSA	nicht auswertbar		3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	1 (3)	2 (3)	2 (3)	nicht auswertbar
Parallux	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	1 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	1 (3)
Enrofloxacin										
ROSA	3 (3)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)	2 (3)	3 (3)
Aminoglykoside/Makrolide										
Immunomat	n. d.	n. d.	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	nicht auswertbar	

Legende:

3 (3)	alle Testergebnisse ohne Abweichung
2 (3)	ein Testergebnis aus drei verändert
1 (3)	zwei Testergebnisse aus drei verändert
0 (3)	alle Testergebnisse verändert

3.2.4.2 Überprüfung des Einflusses einer erhöhten Keimzahl auf die Schnelltestsysteme

3.2.4.2.1 Herstellung des Probenmaterials und Durchführung

Zur Überprüfung des Einflusses einer erhöhten Keimzahl auf die Schnelltestsysteme sollten Proben mit einem Keimgehalt von ca. 10^6 Keime/ml untersucht werden. Derartig hohe Keimgehalte kommen in Anlieferungsmilch üblicherweise nicht vor. In Einzelfällen können sie jedoch durchaus auftreten, zum Beispiel bei einer Unterbrechung der Kühlkette oder bei unsachgemäßer Lagerung. Für die folgenden Untersuchungen mussten die hohen Keimzahlen künstlich erzeugt werden. Als Probenmaterial diente hemmstofffreie Rohmilch, wobei diese 3,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet wurde. Anschließend wurde der Keimgehalt nach Methode L 06.00-19 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG mittels Tropfplattenverfahren bestimmt, wobei Platten der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} ausgezählt wurden. Es wurde eine Keimzahl von 4,14 x 10^6 Keime/ml ermittelt. Nach entsprechender Verdünnung mit hemmstofffreier Rohmilch und nochmaliger Zählung wurde schließlich der Keimgehalt von ca. 10^6 Keimen/ml für die Untersuchungen erreicht. Anschließend wurde ein Teil der Proben mittels Zugabe der Referenzantibiotika künstlich kontaminiert. Die Durchführung der Schnelltests erfolgte wie unter 3.2.1.2. beschrieben. Es wurden zehn Untersuchungen je Testsystem und Probenmaterial durchgeführt. Die Untersuchungen wurden auf zwei Tage aufgeteilt.

3.2.4.2.2 Ergebnisse

Es wurde für keines der Schnelltestsysteme eine Beeinträchtigung der Nachweissicherheit durch einen erhöhten Keimgehalt (> 10^6 Keime/ml) festgestellt, d.h. bei jeweils zehn durchgeführten Messungen traten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse auf.

3.2.4.3 Überprüfung des Einflusses eines erhöhten Zellgehalts auf die Schnelltestsysteme

3.2.4.3.1 Probenmaterial und Durchführung

Für die Überprüfung des Einflusses eines erhöhten Zellgehalts stand als Probenmaterial das Einzelgemelk einer unbehandelten Kuh aus der Herde des Lehr- und Versuchsguts der Tierärztlichen Fakultät zur Verfügung. Der zuvor am Hof durchgeführte Schalm-Test zeigte ein hochpositives Ergebnis (+++; > 5 Mio. Zellen/ml). Zur Bestimmung des genauen Zellgehalts fand eine Zellzahlbestimmung mittels fluoreszenzoptischem Verfahren (Fossomatic-5000) durch den Milchprüfring Bayern e.V. in Wolnzach statt, bei dem ca. 6-7 Mio. Zellen/ml gezählt wurden. Anschließend fand eine Keimzahlbestimmung mittels Tropfplattenverfahren nach Methode L 06.00-19 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG statt, um die Möglichkeit einer übermäßigen Verkeimung der Probe auszuschließen. Zur Erzielung der erwünschten Zellzahl (ca. 10^6 Zellen/ml) wurde die Probe entsprechend mit hemmstofffreier Rohmilch verdünnt. Des Weiteren wurde mittels zwei unterschiedlichen mikrobiologischen Referenzverfahren (MRL Suchtest und BRT Hemmstofftest) jeweils im Vierfachansatz die Hemmstofffreiheit der Probe bestätigt. Anschließend wurde ein Teil der Probe mittels Zugabe der Referenzantibiotika künstlich kontaminiert. Die Durchführung der Schnelltests erfolgte wie unter 3.2.1.2. beschrieben. Es wurden zehn Untersuchungen je Testsystem und Probenmaterial durchgeführt, wobei die Untersuchungen auf zwei Tage aufgeteilt wurden.

3.2.4.3.2 Ergebnisse

Für einige Testsysteme wurde eine Beeinträchtigung der Nachweissicherheit durch einen erhöhten Zellgehalt festgestellt. Nur zwei Systeme (Charm II und Immunomat) erbrachten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass beim Immunomat die visuelle Auswertung teilweise durch sich bildende Zellkonglomerate in der Flusszelle beeinträchtigt wurde, so dass helle Flecken auf den Aufnahmen entstanden. Während Charm ROSA und Parallux ebenso negative Rohmilch mit erhöhtem Zellgehalt als negativ erkannten, zeigte das Charm ROSA Testsystem im Tetracyclin-Nachweis zu 30 % falsch-negative Testergebnisse. Mit dem Parallux-System wurden für den Sulfonamid-Nachweis 90 % der negativen Proben erkannt, im „Beta-lactam-Assay“ wurde der Penicillin G-Nachweis beeinflusst, der zu 60 % falsch-negative Ergebnisse

erbrachte. Der Enrofloxacin-Nachweis des Charm ROSA Testsystem und die Aminoglykosid/ Makrolid-Nachweise des Immunomaten zeigten keine Beeinflussung der Testergebnisse durch einen erhöhten Zellgehalt. Die detaillierten Ergebnisse sind in Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

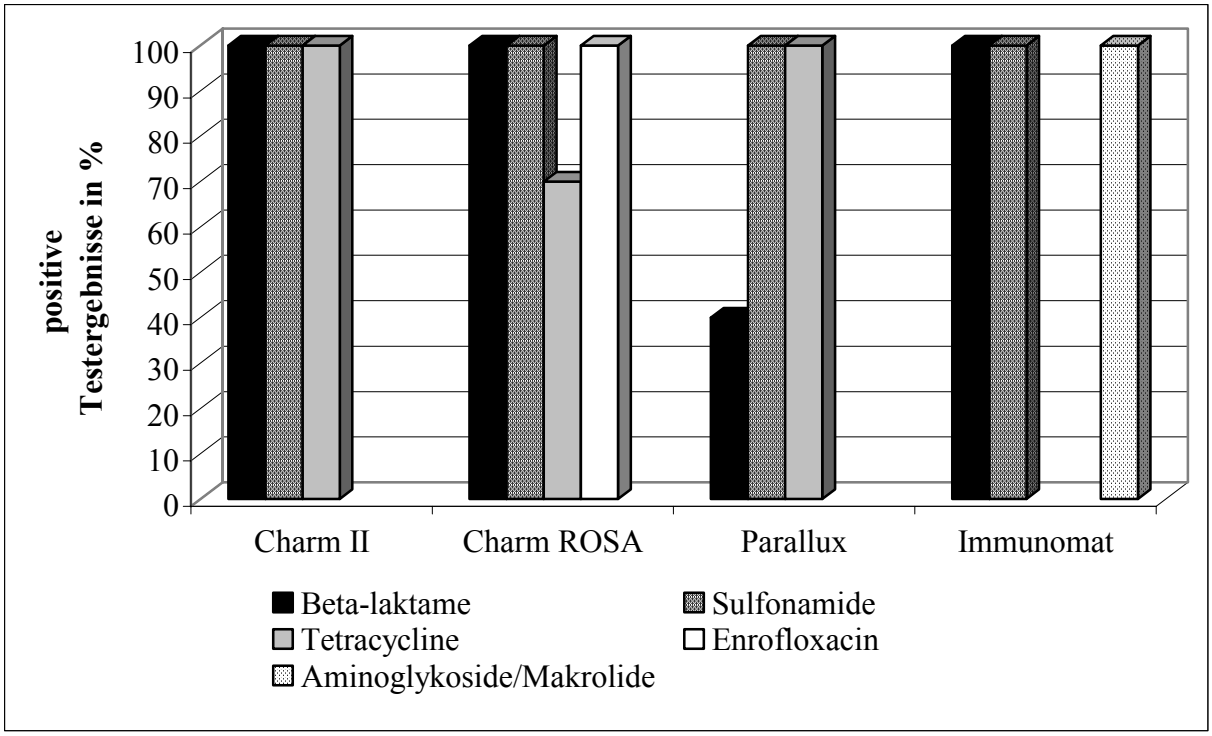


Abbildung 11: prozentualer Anteil positiver Testergebnisse für mit Antiinfektiva dotierte Rohmilch mit erhöhter Zellzahl (ca. 10^6 Zellen/ml; n=10)

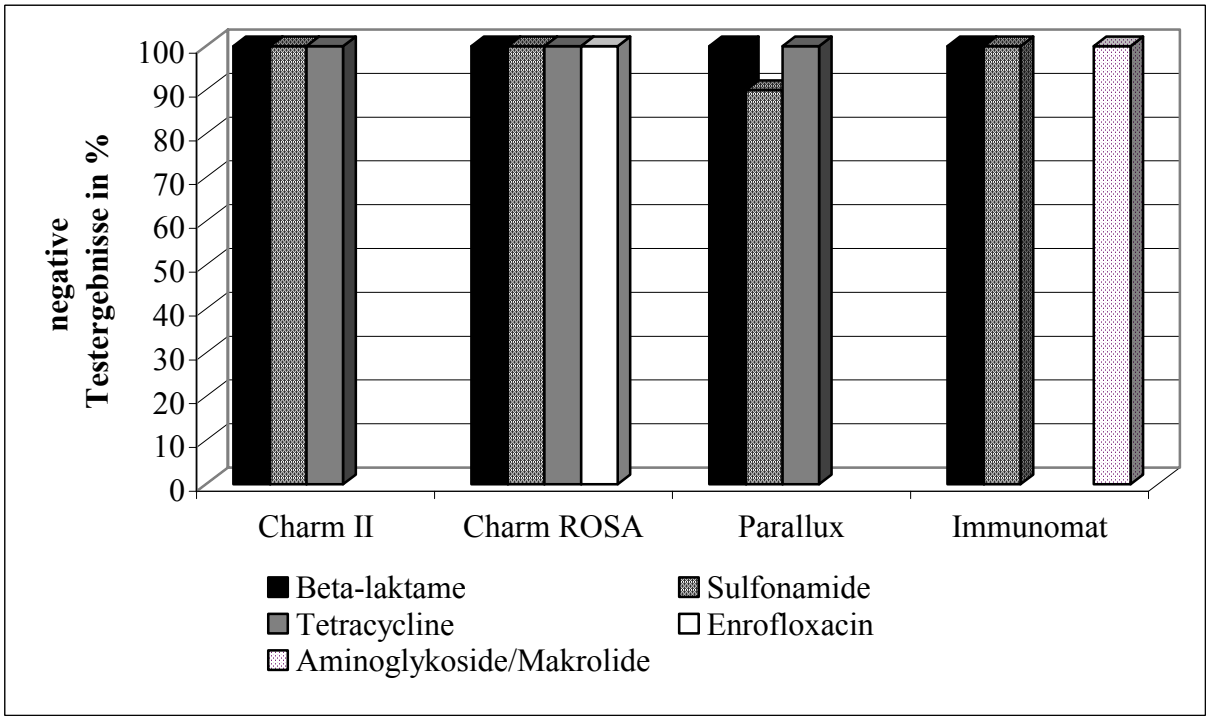


Abbildung 12: prozentualer Anteil negativer Testergebnisse für hemmstofffreie Rohmilch mit erhöhter Zellzahl (ca. 10^6 Zellen/ml; n=10)

3.2.5 Überprüfung der Anwendbarkeit der Schnelltestsysteme auf Milch anderer Tierarten

3.2.5.1 Probenmaterial und Durchführung

Die Schaf- und Ziegenmilch stammte von unbehandelten Tieren aus Herden bayerischer Kleinbetriebe, die Kamelmilch wurde vom Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, zur Verfügung gestellt. Die Milch wurde bis zur Untersuchung bei -18°C gelagert und am Tag der Analyse im Wasserbad (ca. 43°C) aufgetaut. Anschließend wurde ein Teil der Proben mittels Zugabe der Referenzantibiotika künstlich kontaminiert. Die Durchführung der Schnelltests erfolgte wie unter 3.2.1.2. beschrieben. Es wurden zehn Untersuchungen je Testsystem und Probenmaterial durchgeführt wobei die Untersuchungen auf zwei Tage aufgeteilt wurden.

3.2.5.2 Ergebnisse

3.2.5.2.1 Untersuchung von Schafmilch

Für die Untersuchung von Schafmilch waren alle vier Schnelltestsysteme gut geeignet, es wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse festgestellt. Die visuelle Auswertung der Charm ROSA Enrofloxacin-Teststreifen wurde durch eine starke Schlierenbildung des Farbstoffes erschwert, die Auswertung mittels Reader wurde jedoch nicht beeinträchtigt.

3.2.5.2.2 Untersuchung von Ziegenmilch

Auch für die Untersuchung von Ziegenmilch waren alle Schnelltestsysteme gut geeignet. Alle Tests zeigten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse und erfüllten somit die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität in vollem Umfang.

3.2.5.2.3 Untersuchung von Kamelmilch

Die Untersuchung von Kamelmilch mittels Charm II ergab falsch-positive Ergebnisse im Beta-laktam-Nachweis und falsch-negative Testergebnisse im Sulfonamid-Nachweis. Der Enrofloxacin-Nachweis des Charm ROSA Testsystem ergab falsch-negative Ergebnisse, der Tetracyclin-Nachweis dieses Systems schien für den Einsatz mit Kamelmilch nicht geeignet zu sein, da alle Ergebnisse aufgrund der starken Schlierenbildung und der fehlenden Kontrolllinie weder visuell noch instrumentell auswertbar waren. Die Messungen mittels Parallux-System und Immunomaten wiesen keine falsch-positiven oder -negativen Testergebnisse auf. Abbildungen 13 und 14 zeigen die Ergebnisse für Kamelmilch im Detail.

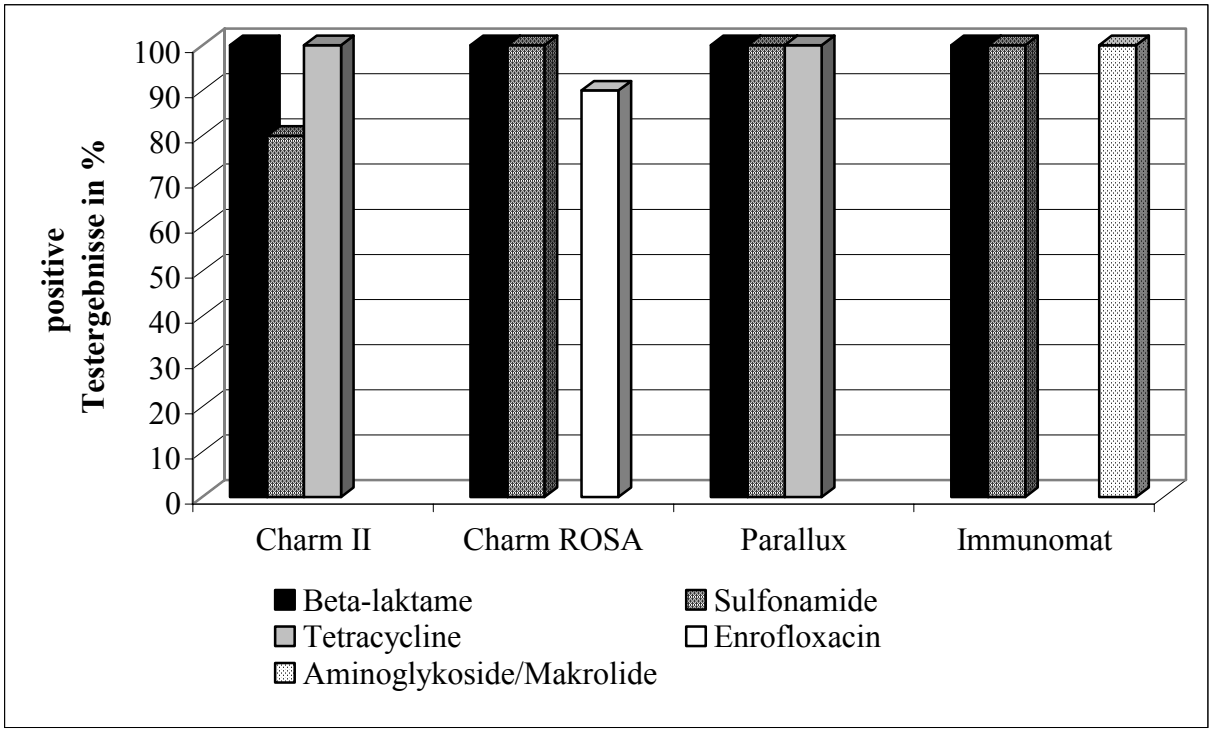


Abbildung 13: prozentualer Anteil positiver Testergebnisse für mit Antiinfektiva dotierte Kamelmilch (n=10)

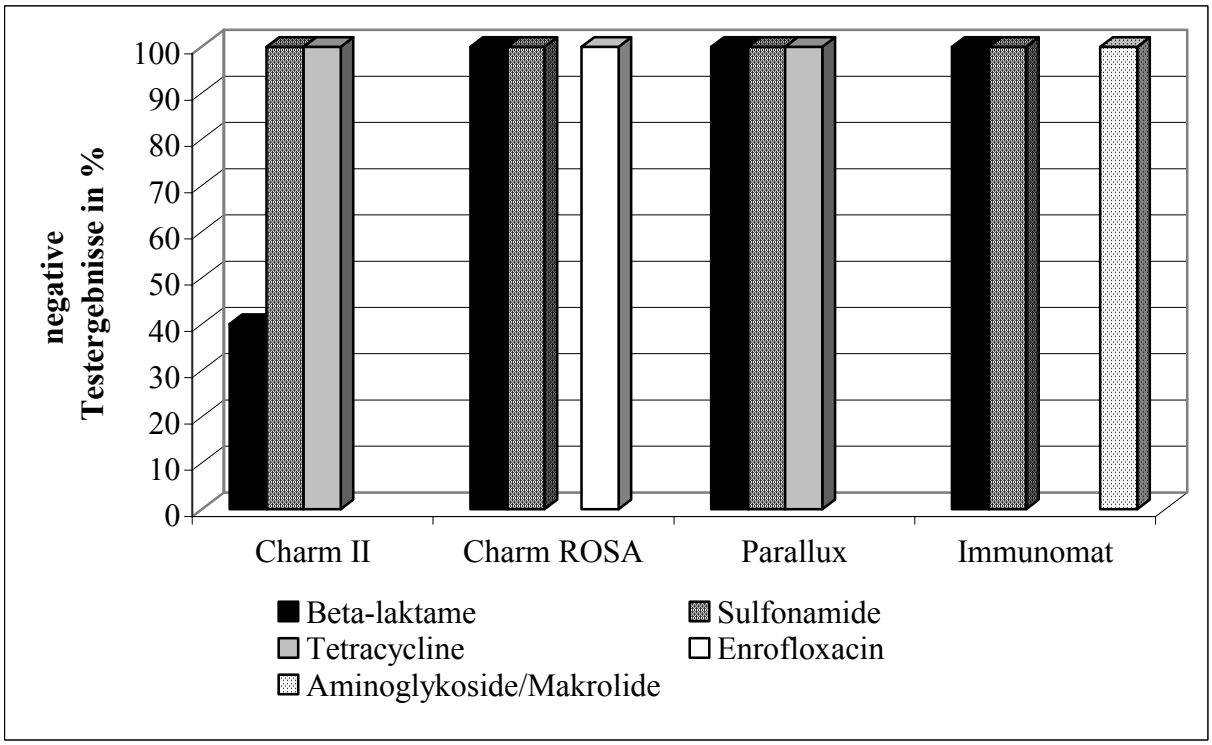


Abbildung 14: prozentualer Anteil negativer Testergebnisse für hemmstofffreie Kamelmilch (n=10)

3.2.6 Validierung der Schnelltestsysteme anhand hemmstoff-positiver und hemmstoff-negativer Praxisproben

3.2.6.1 Probenmaterial und Durchführung

Anhand mittels BRT Hemmstofftest vorgetesteter Praxisproben sollte eine weitere Validierung der vier Schnelltestsysteme vorgenommen werden. Hierzu standen insgesamt 61 Praxisproben zur Verfügung, wobei davon 31 Proben aus der Untersuchungstätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. (MPR) stammten, 19 Proben gingen während der Anfertigung dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät ein (Mai 2004 bis Mai 2005) und elf Tankmilchproben stammten von Kühen der Herde des Lehr- und Versuchsgutes der Tierärztlichen Fakultät in Oberschleißheim.

Die Milchproben wurden bei -18°C am Institut gelagert, am Tag der Untersuchung bei ca. 43°C im Wasserbad aufgetaut und spätestens am nächsten Tag verwendet. Für alle Proben wurden zuerst unabhängig vom Vorbericht mikrobiologische Hemmstofftests (MRL Suchtest bzw. BRT Hemmstofftest) durchgeführt. Es kamen die unverdünnten Proben und Proben mit Penicillinase-Zusatz (Penase) zur Differenzierung zwischen Beta-laktam-Antibiotika und andersartigen Hemmstoffen zum Einsatz. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren Grundlage für den Vergleich mit den Schnelltestsystemen.

Für jede Probe wurden alle zur Verfügung stehenden Nachweise der einzelnen Schnelltestsysteme angewendet. Die Durchführung erfolgte wie in 3.2.1.2 beschrieben. Für neun positive und zehn negative Praxisproben konnte eine Überprüfung mittels Immunomat aus Mangel an Untersuchungsmaterial nicht durchgeführt werden.

3.2.6.2 Ergebnisse

Von den 31 Proben, die im Vorfeld mittels mikrobiologischem Hemmstofftest positiv getestet wurden, wurden mit dem Charm II-Test vier Proben (Proben Nr. 1, 5, 8, 17), mit dem Charm ROSA Test neun Proben (Proben Nr. 1, 2, 4, 7, 8, 17, 22, 28, 29) und mit dem Parallux Test insgesamt 14 Proben (Proben Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 17, 19, 22, 25, 28) dennoch als hemmstoff-negativ getestet. Von den 22 mittels Immunomat getesteten, im mikrobiologischen Hemmstofftest positiven Proben, beurteilte dieses Testsystem neun Proben als hemmstoff-

negativ (Proben Nr. 3, 4, 6, 7, 8, 16, 17, 21, 31). Zwei Proben wurden von allen Testsystemen übereinstimmend als hemmstoff-negativ beurteilt (Proben Nr. 8, 17).

Unter Einbeziehung des Charm II als Bezugsgröße (27 Proben positiv getestet) wurden sechs Proben vom Charm ROSA Test als hemmstoff-negativ eingestuft (Proben Nr. 2, 4, 7, 22, 28, 29), der Parallux testete sogar elf davon hemmstoff-negativ (Proben Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 19, 22, 25, 28). Mittels Immunomat wurden aus allen untersuchten Proben neun von 18 im Charm II als positiv eingestuften Proben als negativ beurteilt (Proben Nr. 3, 4, 6, 7, 8, 16, 21, 22).

Die Hemmstoffe waren hauptsächlich der Gruppe der Beta-laktame zuzuordnen, was einerseits durch die weitgehende Penicillinase-Labilität der Substanzen sowie durch die Reaktion der entsprechenden Nachweise der einzelnen Testsysteme bestätigt wurde. Anhand des „Beta-lactam-Assay“ des Parallux-Systems konnte sogar eine weitere Differenzierung vorgenommen werden. Demnach wurden 12 Proben im Penicillin-Nachweis, zwei Proben im Cloxacillin- und Penicillin-Nachweis und zwei Proben im Ceftiofur-Nachweis positiv getestet. Zumeist stimmte diese Differenzierung mit den Ergebnissen des Immunomaten überein.

Das Charm II System wies im Falle einer Probe (Probe Nr. 4) Sulfonamide nach, was aufgrund der Penicillinase-Stabilität der Probe durchaus plausibel erscheint. Von den übrigen Testsystemen wurde diese Probe in allen Nachweisen negativ beurteilt. Mittels Immunomat wurde in zwei Proben zusätzlich zu Penicillinen Neomycin nachgewiesen (Proben Nr. 10 und 14). Tabelle 19 zeigt die einzelnen Ergebnisse für hemmstoff-positive Praxisproben im Überblick.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

-	= Probe wurde negativ getestet		
Ampi	= Ampicillin	Cepha	= Cephapirin
Cloxa	= Cloxacillin	Neo	= Neomycin
Ceft	= Ceftiofur	Pen	= Penicillin

Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse der Schnelltests für die von den mikrobiologischen Hemmstofftests (BRT) als positiv getestete Praxisproben

Probe Nr.	BRT-Ergebnis nach Penase-Zugabe	Charm II	Charm ROSA	Parallux	Immunomat
1	-	-	-	-	Cloxa
2	-	Beta-laktame	-	-	Ampi
3	-	Beta-laktame	Beta-laktame	-	-
4	positiv	Sulfonamide	-	-	-
5	-	-	Beta-laktame	-	Cloxa/Pen
6	-	Beta-laktame	Beta-laktame	-	-
7	-	Beta-laktame	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	Beta-laktame	Beta-laktame	-	Cepha
10	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	Pen/Neo
11	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	Pen
12	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	Cepha/Pen
13	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	Pen
14	positiv	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	Pen/Neo
15	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	Ampi/ Cloxa/ Pen
16	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Ceft)	-
17	-	-	-	-	-
18	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Ceft)	Ampi
19	-	Beta-laktame	Beta-laktame	-	Ampi/Pen
20	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Cloxa; Pen)	Cloxa

Fortsetzung Tabelle 19:

Übersicht der Ergebnisse der Schnelltests für die von den mikrobiologischen Hemmstofftests (BRT) als positiv getestete Praxisproben

Probe Nr.	BRT-Ergebnis nach Penase-Zugabe	Charm II	Charm ROSA	Parallux	Immunomat
21	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	-
22	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	-
23	-	Beta-laktame	-	-	n. d.
24	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	n. d.
25	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	n. d.
26	-	Beta-laktame	Beta-laktame	-	n. d.
27	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	n. d.
28	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Pen)	n. d.
29	-	Beta-laktame	-	-	n. d.
30	-	Beta-laktame	-	Beta-laktame (Pen)	n. d.
31	-	Beta-laktame	Beta-laktame	Beta-laktame (Cloxa; Pen)	n. d.

Die Untersuchungen der in den mikrobiologischen Hemmstofftests als hemmstoff-negativ eingestuften Proben ergab eine weitgehende Übereinstimmung sämtlicher Testsysteme. Zwei Proben (Proben Nr. 5 und 7) wurden mittels Charm II positiv getestet, wobei in einer Probe Sulfonamide, in der anderen Beta-laktame nachgewiesen wurden. Drei Proben (Proben Nr. 2, 3 und 5) wurden vom Immunomat positiv getestet, wobei zwei Proben (Proben Nr. 2 und 3) im Penicillin-Nachweis positiv waren, die Dritte im Cloxacillin-Nachweis. Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse für hemmstoff-negative Proben in der Übersicht. Es wurden dieselben Abkürzungen verwendet wie in Tabelle 19.

Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der Schnelltests für die von den mikrobiologischen Hemmstofftests (BRT) als negativ getestete Praxisproben

Probe Nr.	Charm II	Charm ROSA	Parallux	Immunomat
1	-	-	-	-
2	-	-	-	Pen
3	-	-	-	Pen
4	-	-	-	-
5	Sulfonamide	-	-	Cloxa
6	-	-	-	-
7	Beta-laktame	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	n. d.
22	-	-	-	n. d.
23	-	-	-	n. d.
24	-	-	-	n. d.
25	-	-	-	n. d.
26	-	-	-	n. d.
27	-	-	-	n. d.
28	-	-	-	n. d.
29	-	-	-	n. d.
30	-	-	-	n. d.

4 DISKUSSION

Tierarzneimittelrückstände in Milch stellen nicht nur ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher dar, sondern können aufgrund ihres negativen Einflusses auf die Herstellung fermentierter Milchprodukte auch zu Verlusten in der Milchwirtschaft führen. Die zuverlässige Detektion möglichst vieler Antibiotika- und Sulfonamidklassen ist deshalb aus rechtlicher Sicht notwendig (Einhaltung der MRL-Werte nach EU-Verordnung Nr. 2377/90) und im Sinne einer guten Molkereipraxis ausdrücklich erwünscht (SUHREN und WALTE, 2003). In der Praxis werden jedoch meist mikrobiologische Hemmstofftests oder Schnelltests eingesetzt, die hauptsächlich für den Nachweis von Beta-laktam-Antibiotika ausgelegt sind und andere Antiinfektiva-Klassen entweder gar nicht oder mit nur ungenügender Empfindlichkeit erfassen (GUSTAVSSON und STERNESJÖ, 2004). In den letzten Jahren wurden deshalb verschiedene Testsysteme für einen differenzierteren Nachweis von Antiinfektiva in Milch entwickelt. Da für einige dieser Verfahren jedoch nur unzureichende Daten zur Identifikationsfähigkeit verschiedener Antiinfektiva vorliegen, sollten diese im Rahmen einer Vergleichsuntersuchung für drei kommerziell erhältliche Schnelltestsysteme und einen Biosensor-Prototyp ergänzt werden.

4.1 Funktionalität der Schnelltestsysteme

4.1.1 Geräte

Aus praktischer Sicht haben unkomplizierte Systeme, die ohne große Technik auskommen, gegenüber Systemen mit hohem technischem Aufwand einen Vorteil. Dies gilt vor allem für das Charm II System, das neben dem eigentlichen Messgerät umfangreiches Zubehör benötigt und insgesamt ca. 1,50 m Laborfläche beansprucht. Demgegenüber besitzt das Parallux-System den Vorteil, dass hier alle benötigten Instrumente in eine Geräteeinheit integriert sind, die allerdings immer noch relativ viel Platz einnimmt. Beide Systeme wurden als Laborgeräte entwickelt und sind als solche gut einsetzbar (MACNEIL et al., 1991; MITCHELL et al., 1998; NEAVES, 1999). Das Charm ROSA Testsystem wurde für den Einsatz auf dem Milchsammelwagen konzipiert und zeichnet sich folglich durch einen sehr einfachen Geräteaufbau aus. Die instrumentelle Auswertung mittels Lesegerät (Reader) ist möglich. Technisch gesehen ist dieses System am praktischsten. Der Immunomat vereinigt alle notwendige Technik in einer Geräteeinheit, die nur wenig mehr Platz einnimmt als der

Parallux. Er ist als Prototyp für einen späteren Einbau in einen Milchsammelwagen konzipiert, wobei dies das derzeitige Design noch nicht zulässt.

Alle Systeme besitzen die Möglichkeit zur Datenarchivierung mittels Computer. Das Charm II Messgerät, der Charm ROSA Reader und der Parallux-Processor besitzen eine serielle Schnittstelle zum Anschluss an einen PC, im Falle des Immunomaten ist der Laptop bereits integriert.

4.1.2 Testreagenzien

Die Reagenzien aller Testsysteme müssen zur längerfristigen Lagerung gekühlt werden. Allerdings ist es möglich, die Reagenzien von Charm II, Charm ROSA und Parallux kurzfristig (ca. 12 Stunden) auch bei Raumtemperatur zu lagern. Die Reagenzien des Immunomaten sollten immer gekühlt werden, was aus praktischer Sicht von Nachteil ist.

Einige Reagenzien des Charm II sind radioaktiv und müssen gesondert entsorgt werden. OKERMAN et al. (2003) sehen hierin einen großen Nachteil beispielsweise gegenüber dem Parallux, dessen Reagenzien ungiftig sind. CHARM und CHI (1988) empfehlen, sich im Vorfeld über lokale Vorschriften zur Entsorgung zu erkundigen, erwähnen jedoch keine negativen Auswirkungen durch die Radioaktivität. Für SCHIELKE (1993) war eine besondere, über die normalen Laborvorschriften hinausgehende Vorsicht im Hinblick auf die Handhabung mit dem radioaktiven Material nicht erforderlich. Die aus eigenen Untersuchungen angefallenen Szintillationsvials wurden als Sondermüll entsorgt, was mit erheblichen Mehrkosten verbunden war.

4.1.3 Testdurchführung

Ein großer Nachteil für den Charm II ist sein komplizierter Testablauf, welcher neun bis elf Arbeitsschritte beinhaltet, je nach Nachweis 15-20 min dauert und ohne grundlegende Laborkenntnisse nicht durchführbar ist. Der Ablauf ist je nach Nachweis unterschiedlich, was die Durchführung weiterhin kompliziert. Demgegenüber beinhaltet die größtenteils automatisierte Testdurchführung des Parallux weniger Arbeitsschritte, auch die Testdauer ist

mit ca. vier Minuten im Gegensatz zum Charm II kurz. Mit einer Testdauer von acht Minuten ist der Charm ROSA zwar nicht so schnell wie der Parallux, doch ist die einfache Testdurchführung (Ein-Schritt-Test) sein größter Vorteil. Die eigentliche Testdurchführung mittels Immunomat ist einfach und mit ca. drei Minuten pro Messung am schnellsten. Allerdings gehen jeder Messreihe eine umfangreiche Reagenzienvorbereitung und ein intensiver Spülgang voraus, welcher ca. 30-40 Minuten in Anspruch nehmen kann.

Ein gemeinsamer Nachteil aller Testsysteme ist die notwendige Kalibrierung. Diese ist bei Charm II, Charm ROSA und Parallux einmal täglich notwendig, im Falle des Immunomaten vor jeder Messreihe oder zumindest für jede neue Chip-Charge (KNECHT et al., 2004) und verursacht aufgrund des Verbrauchs weiterer Testreagenzien zusätzliche Kosten.

Obwohl mittels Charm II nur die Messung einer Substanzklasse (Beta-laktame *oder* Sulfonamide *oder* Tetracycline) pro Testeinheit möglich ist, können bis zu zwölf Proben gleichzeitig in einer Messung auf diese Substanzgruppe hin überprüft werden. Dies bedeutet vor allem für Labors mit hohem Probendurchlauf eine erhebliche Zeitersparnis. Sowohl mittels Charm ROSA als auch mittels Parallux sind vier Proben pro Testdurchgang untersuchbar. Alternativ dazu kann eine Probe mit Charm ROSA auch auf vier verschiedene Substanzklassen hin untersucht werden. Mittels Parallux ist es je nach Kartuschen-Zusammensetzung sogar möglich, eine Probe parallel auf vier spezifische Substanzen hin zu überprüfen, was eine Substanz-Identifizierung ermöglicht. Hierin sehen OKERMAN et al. (2003) den größten Vorteil dieses Systems. Der Immunomat ermöglicht ebenfalls eine simultane Detektion von bis zu elf verschiedenen Antiinfektiva pro Testdurchlauf und Probe, was ihn nach Abschluss der Entwicklungsphase vor allem zum Screening von Anlieferungs-milch interessant machen dürfte (STRASSER et al., 2003; KNECHT et al., 2004).

Im Hinblick auf die Ergebnishaltbarkeit sind alle Testsysteme positiv zu erwähnen. Dabei fällt vor allem die überraschende Haltbarkeit der Charm II-Testergebnisse auf. Obwohl der Hersteller zu Versuchsbeginn nochmals explizit auf die Lichtempfindlichkeit der Reagenzien hingewiesen hatte, waren die Ergebnisse ohne weiteres bis zu 24 Stunden reproduzierbar.

4.2 Sensitivität und Spezifität der Testsysteme

In der Praxis ist vor allem die Erfassbarkeit der gesetzlich festgelegten Höchstmengen (MRL-Werte) von großer Bedeutung für die Wahl eines Testsystems. Charm II, Charm ROSA und Parallux waren alle in der Lage, wichtige Antiinfektiva auf oder unterhalb des MRL-Wertes nachzuweisen. Hierbei erwies sich vor allem der Charm II als sensibel und gruppenspezifisch, so dass eine Untersuchung viele relevante Antiinfektiva in ausreichender Empfindlichkeit abdeckt. Niedrige Nachweisgrenzen können aber auch von Nachteil sein, denn eine Einhaltung des MRL-Wertes ist dadurch nicht von einer Überschreitung desselbigen unterscheidbar (ANDERSON et al., 1995), insbesondere wenn keine Absicherung mit mikrobiologischen Referenzverfahren möglich ist. Der Charm II Test ist deshalb hauptsächlich als Screening-Test anzusehen. Positiv getestete Proben sollten unbedingt nach Herstellervorgabe durch erneutes Testen verifiziert werden (SENYK et al., 1990; CARLSSON und BJÖRCK, 1991; CARLSSON et al., 1992; JAGLAN et al., 1992; ANDERSON et al., 1995; CHARM SCI. INC., 2000). Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Nachweise des Charm ROSA und Parallux als spezifischer gegenüber der überprüften Substanzen, wobei die Ergebnisse weitgehend mit denen von REYBROECK (2002) und REYBROECK und OOGHE (2002). übereinstimmten.

Der Immunomat zeigte beim Nachweis wichtiger Beta-laktame (Penicillin G, Ampicillin) deutliche Defizite. Im Falle des Ampicillins könnte der Grund in der geringen Kopplungsdichte des Konjugates liegen (EIBERLE, 2004), im Falle des Penicillin G an der geringen Affinität des Antikörpers. Um deutliche Messsignale zu erhalten, mussten die Immunreagenzien für beide Nachweise in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, was in der Folge zu einem Verlust der Sensitivität führen kann (STRASSER, 2003). Die Detektion von Cloxacillin und Cephapirin war problemlos unterhalb des MRL-Wertes möglich, wobei eine Kreuzreaktion zwischen Cloxacillin-Antikörper und Dicloxacillin, wie sie auch STRASSER et al. (2003) nachwiesen, beobachtet werden konnte. Von den Sulfonamiden wurden nur wenige auf MRL-Niveau erfasst. Die von KNECHT et al. (2004) beobachtete Kreuzreaktion zwischen Sulfadiazin-Antikörper und Sulfamethazin-Konjugat konnte bestätigt werden. Da dies bei der qualitativen Überprüfung von Proben von Nachteil sein kann (Ergebnisverfälschung), wurde die Einführung eines Korrekturfaktors bereits vorgeschlagen (KNECHT et al., 2004). Hinsichtlich der getesteten Aminoglykoside und Makrolide stimmten die mittels Immunomat erstellten Nachweisgrenzen nicht mit denen von EIBERLE (2004)

überein, welche wesentlich niedriger waren. Allerdings wurde in eigenen Untersuchungen das Versuchsprotokoll modifiziert und ein neues, vereinfachtes Auswerteverfahren generiert, beides mögliche Ursachen für diese Abweichung der Ergebnisse. Die von STRASSER et al. (2003) ermittelte höhere Affinität des Streptomycin-Antikörpers gegenüber Dihydrostreptomycin als Streptomycin selbst konnte in eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Der Nachweis der Clavulansäure war mittels Charm II und Charm ROSA auf doppeltem MRL-Niveau möglich, was angesichts des durchaus üblichen Einsatzes dieser Substanz in Form von Kombinationspräparaten (KROKER et al., 2002) ein Vorteil ist. Die Fähigkeit zum Nachweis diverser Metaboliten qualifiziert Testsysteme für Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten von Antiinfektiva (SUHREN und HEESCHEN, 1987). Auch zur Einhaltung gesetzlicher Höchstmengen ist die Detektion der Metaboliten von Vorteil, da die Substanzen oftmals mit gemeinsamen MRL-Werten belegt sind (z.B. Ceftiofur und Desfuroylceftiofur oder Tetracycline und ihre epimeren Formen). Andererseits wird dadurch auch die Testsensibilität erhöht, was laut ANDERSON et al. (1995) und OKERMAN et al. (2003) zu vermehrt falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Desfuroylceftiofur war von Charm II, Charm ROSA und Parallux, das Tetracyclin-Epimer mittels Charm II und Parallux nachweisbar. Der Charm II Test erfasste zahlreiche Sulfonamide, wodurch er dem gemeinsamen MRL-Wert für diese Substanzklasse am ehesten gerecht wird. Mittels Parallux und Immunomat war hydrolysiertes Penicillin G (BPO) in hohen Konzentrationen nachweisbar, ein Hinweis darauf, dass die verwendeten Antikörper auch gegen den geöffneten Beta-laktam-Ring gerichtet sind (ROHNER et al., 1985; BLACKMORE et al., 1988).

Durch Erstellung von Standardkurven in Rohmilch für verschiedene Substanzen konnte für den Charm II eine Quantifizierung der Rückstandsmengen vorgenommen werden. Für Sulfonamide wurden alle Standards bzw. Proben 1:10, für Tetracycline 1:3 mit hemmstofffreier Rohmilch verdünnt. Desgleichen gilt für die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität. Dies war eine Vorgabe des Herstellers, um die Sensitivität des Nachweises auf MRL-Niveau herabzusetzen und ihn auf diese Weise für den europäischen Markt interessant zu machen. Vergleicht man die durch Kurvendiskussion ermittelten Nachweisgrenzen für Beta-laktame und Sulfonamide mit den entsprechenden Herstellerangaben, so wurden diese durch die quantitative Auswertung herabgesetzt. Eine Auswertung anhand des Kontrollpunktes würde den Test viel unempfindlicher machen. Die für die Tetracycline ermittelten Standardkurven zeichneten sich durch einen nicht-sigmoidalen Kurvenverlauf und einen sehr hohen

Hintergrund aus, weshalb eine Kurvendiskussion mittels Sigma Plot und folglich eine Ermittlung der Nachweisgrenzen und Kreuzreaktionen nicht möglich war. In diesem Fall wurde über den Kontrollpunkt-Vergleich ausgewertet. Ein möglicher Grund für die nicht auswertbaren Kurven könnte sein, dass bei zunehmendem Anstieg der Antibiotika-Konzentration in der Milch die CPM (=counts per minute) des Charm II durch die Sättigung der Antigen-Antikörper-Bindungen nicht weiter abfallen sondern in Form einer Geraden auslaufen (CARLSSON und BJÖRCK, 1992). Da die CPM des Tetracyclin-Nachweises von Haus aus zahlenmäßig höher sind als die der anderen Nachweise, bedingt dies einen ungewöhnlich hohen Hintergrund. Vergleichbare Standardkurven finden sich auch bei SUHREN und HEESCHEN (1987), SCHIELKE (1993), CARLSSON und BJÖRCK (1992) und bei CHARM SCIENCES INC. (o. J. b).

4.3 Einfluss der Milchbeschaffenheit auf die Testsysteme

Ein wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Praxistauglichkeit von analytischen Testsystemen ist ihre Störanfälligkeit bezüglich Veränderungen der Milchbeschaffenheit. So extreme Abweichungen in pH-Wert, Zell- oder Keimzahl, wie sie in eigenen Untersuchungen künstlich erzeugt wurden, sind für Anlieferungsmilch selten, bei Einzelgemelksproben erkrankter Tiere oder bei unsachgemäßer Lagerung oder Transport können sie jedoch durchaus vorkommen.

Alle durchgeführten Nachweise der überprüften Testsysteme wiesen im stark sauren und im stark basischen Bereich vermehrt falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse auf. Dies könnte an der irreversiblen Denaturierung der Rezeptoren liegen (SCHIELKE, 1993), auch eine Instabilität des Tracers (Charm II) bei diesen Extrembedingungen ist vorstellbar. Zudem spielte die Veränderung der Milchkonsistenz (beispielsweise Verdickung des Substrates durch Ausflockung) sicherlich eine Rolle. Eine Erklärung für falsch-negative Ergebnisse im Tetracyclin-Nachweis des Parallux im neutralen pH-Bereich (pH 7) konnte nicht gefunden werden.

In Übereinstimmung mit HUTH et al. (2002) hatte eine erhöhte Keimzahl von ca. 10^6 Keimen/ml keinen Einfluss auf das Parallux-System. Auch die Ergebnissicherheit der anderen Systeme wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Im Falle einer erhöhten Zellzahl (ca. 10^6

Zellen/ml) traten beim Tetracyclin-Nachweis des Charm ROSA und beim Penicillin G-Nachweis des Parallux jeweils falsch-negative Ergebnisse auf. Die Ursache der bezüglich Charm ROSA könnte die Veränderung der Fließeigenschaften der Milch (SALTER et al., 2001) oder die Blockade der Rezeptoren durch den hohen Zellgehalt sein. Weshalb jedoch nur der Tetracyclin-Nachweis davon betroffen ist, bleibt aufgrund der Ungewissheit über die Testzusammensetzung ungeklärt. KROLL (2000) konnte für den Charm MRL-Test für Beta-laktame falsch-negative Ergebnisse bei erhöhter Zellzahl beobachten. Die Beeinflussung des Penicillin G-Nachweises des Parallux durch den Zellgehalt widerspricht den Aussagen von HUTH et al. (2002).

4.4 Beeinflussbarkeit der Schnelltestsysteme durch das Enzym Penicillinase und den Farbstoff Patentblau

Da der Großteil der verwendeten Praxisproben aus der Tätigkeit des Milchprüfrings stammte und dort alle Proben, die auf Hemmstoffe zu untersuchen sind, zu Markierungszwecken mit Patentblau eingefärbt werden, lag es nahe, einen möglichen Einfluss dieses Farbstoffes auf die Systeme zu überprüfen. Eine Beeinflussbarkeit eines der Systeme durch diesen Farbstoff wäre ein Nachteil, denn es würde seine Verwendungsmöglichkeiten stark einschränken. Die Ergebnisse des Charm ROSA (Sulfonamid-Nachweis) fielen durch unvollständige Linien auf dem Teststreifen auf. Dadurch wurden sie instrumentell als ungültig eingestuft und ergaben somit falsch-negative Ergebnisse. Der Tetracyclin-Nachweis des Parallux wies ebenfalls falsch-negative Ergebnisse auf. Die Ursache dafür konnte aufgrund fehlender Kenntnisse über den Rezeptor- bzw. Traceraufbau nicht geklärt werden. Im Charm II Tetracyclin-Test war eine erhebliche Erhöhung der CPM für alle mit Patentblau eingefärbten Proben sichtbar, wodurch der Kontrollpunkt überschritten wurde und falsch-negative Ergebnisse entstanden. Auch hierfür ist der Grund wegen des unbekannten Aufbaus der Testkomponenten unklar.

Durch Zugabe von Penicillinase zu einer hemmstoff-positiven Probe werden im Labor routinemäßig Beta-laktam-Antibiotika von anderen Antiinfektiva abgegrenzt. Der Charm II Test ergab bei Anwesenheit von Penicillinase stets positive Ergebnisse (dotierte und hemmstofffreie Milch). Grund könnte die Schädigung des Tracers (radioaktiv markiertes Penicillin) durch die Penicillinase sein, wodurch es zu einem Ausbleiben der Bindung an den Rezeptor und folglich zu niedrigen CPM und einem positiven Ergebnis kommen könnte. Die

Ergebnisse für mit Cloxacillin dotierte Rohmilch waren bei Zugabe von Penicillinase im Parallux auch nach dreistündiger Inkubationszeit noch positiv. Im mikrobiologischen Hemmstofftest waren sie jedoch negativ. Die Erklärung könnte ein unvollständiger Abbau des Cloxacillins sein, geringe Restmengen der Muttersubstanz waren anschließend mit dem sensiblen Parallux-System immer noch nachweisbar.

4.5 Anwendbarkeit der Schnelltestsysteme auf Milch anderer Tierarten

Aufgrund von Unzulänglichkeiten mikrobiologischer Hemmstofftests zum Nachweis von Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen- oder Kamelmilch (SCHULZE, 2002; STRASSER et al., 2005; ZAADHOF et al., 2005) und der wachsenden Bedeutung dieser Tierarten in Europa, ist eine Überprüfung alternativer Testsysteme dringend empfohlen.

Alle überprüften Systeme erwiesen sich in eigenen Untersuchungen als geeignet für den Nachweis von Antiinfektiva in Schaf- und Ziegenmilch. Dies steht im Gegensatz zu den von SCHULZE (2002) ermittelten Ergebnissen für den Charm MRL Test für Beta-laktame, die dort nicht immer eindeutig waren. Lediglich bei der Anwendung auf Kamelmilch zeigten sich Defizite bei einzelnen Systemen. Charm II wies im Beta-laktam-Nachweis falsch-positive, im Sulfonamid-Nachweis falsch-negative Ergebnisse auf. Charm ROSA zeigte falsch-negative Ergebnisse im Enrofloxacin-Nachweis, der Tetracyclin-Nachweis war auf Kamelmilch nicht anwendbar. Eine Erklärung ist aufgrund der Unkenntnis über die Rezeptoren der Testsysteme schwierig, könnte jedoch in der inhaltlichen Zusammensetzung der Kamelmilch zu finden sein.

4.6 Validierung der Schnelltestsysteme anhand BRT-positiver und BRT-negativer Praxisproben

Um in der Praxis uneingeschränkt nutzbar zu sein, müssen analytische Testsysteme auf ihre Zuverlässigkeit hin überprüft und falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden (GARDNER et al., 1996). Falsch-positive Ergebnisse bedeuten Zeitverlust für das Labor durch wiederholte Prüfung der Probe und eventuelle unbegründete Nachteile für den Landwirt. Dagegen sind beim Auftreten falsch-negativer Ergebnisse ein

Verbleib von Antiinfektiva in der Probe und somit technologische Schäden in Molkereien und gesundheitliche Nachteile für den Verbraucher nicht auszuschließen. Da es sich bei den zur Verfügung stehenden Praxisproben um mittels BRT-vorgetestete Proben handelte, erschien das häufige Vorkommen Beta-laktam-positver Ergebnisse plausibel.

In Übereinstimmung mit dem BRT konnten Hemmstoffe oftmals nur mittels Charm II Test nachgewiesen werden. Bedenkt man seine hohe Sensitivität und sein breites Nachweisspektrum, so ist dies gut nachvollziehbar. Auch die Tatsache, dass häufig Hemmstoffe nur mittels Charm II und/oder Charm ROSA, nicht aber mittels Parallux nachweisbar waren, lässt sich mit der höheren Sensitivität und niedrigeren Spezifität dieser Systeme (v.a. bezüglich selten eingesetzter Cephalosporine) leicht erklären. In zwei Proben konnten mit dem Charm II-Testsystem Sulfonamide nachgewiesen werden. Es könnte sich z.B. um Sulfadiazin handeln, denn die Nachweisgrenzen des Charm ROSA und des Parallux-Systems liegen für diese Substanz weit oberhalb der des Charm II. Zudem ist der störende Einfluss von Patentblau auf die Nachweissicherheit einiger Systeme zu bedenken. Die Nachweisgrenzen des Immunomat für Beta-laktame liegen teilweise über den Nachweisgrenzen anderer Systeme, so dass er oftmals ein negatives Ergebnis aufwies. In zwei Proben konnte mittels Immunomat zusätzlich zu Penicillin Neomycin nachgewiesen werden, wobei eine der Proben durch ihre Penicillinase-Festigkeit im BRT-Hemmstofftest auffiel, was das Ergebnis des Immunomaten zusätzlich untermauert. Neomycin und Benzylpenicillin finden sich in zahlreichen Kombinationspräparaten. Andererseits wurden einige Proben mittels Immunomat positiv auf Beta-laktame getestet, obwohl sie entweder BRT-negativ waren oder von allen oder zumindest einem anderen System als negativ eingestuft wurden. Dies erscheint aufgrund der offensichtlichen Defizite des Immunomaten bezüglich des Nachweises wichtiger Beta-laktam-Antibiotika als eher un-wahrscheinlich, so dass diese Ergebnisse als falsch-positiv eingestuft werden können. Hierbei ist zu bedenken, dass viele der eingesetzten Antikörper (auch der Penicillin-Antikörper) kommerziell erworben wurden. Ihre Charakteristika (z.B. Kreuzreaktionen) waren weder in vollem Umfang bekannt noch wurden sie in eigenen Experimenten untersucht.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass zwar keines der Testsysteme alle überprüften Kriterien zu 100 % erfüllt, sie jedoch alle ihre Stärken und Schwächen aufweisen.

Speziell aus praktischer Sicht ist der **Charm ROSA** zu empfehlen, da er mit wenig Gerät auskommt und einfach zu bedienen ist. Dennoch sind zahlreiche Reagenzien erhältlich, mit denen sich ein breites Spektrum an verschiedenen Antiinfektiva abdecken lässt und trotz seiner verhältnismäßig hohen Spezifität (speziell im Falle der Sulfonamide) werden die MRL-Werte der wichtigsten Antibiotika und Sulfonamide erfasst. Zudem ist er der einzige Test, für den ein Nachweis für Enrofloxacin in Milch erhältlich ist, was angesichts des häufigen Einsatzes dieses Antiinfektivums in der Veterinärmedizin und der extremen Nachweisschwierigkeiten mittels anderer Testsysteme ein großer Vorteil ist.

Ist ein sensibles, gruppenspezifisches Laborgerät erwünscht, das kaum durch Änderungen der Milchbeschaffenheit beeinflussbar ist, so ist der **Charm II Test** zu empfehlen. Auch zum Nachweis von Antiinfektiva in anderen Milcharten außer Kuhmilch ist dieses System gut geeignet. Die Möglichkeit zur Quantifizierung bei Bekanntsein des Wirkstoffes ist vorhanden. Aufgrund der umfangreichen Technik, des komplizierten Testablaufs und der hohen Materialkosten bietet es hauptsächlich für große Labors mit einem hohen Probendurchlauf eine gute Alternative zu herkömmlichen Hemmstofftests.

Für eine sofortige Identifizierung einzelner Substanzen innerhalb der nachgewiesenen Antiinfektiva-Gruppe empfiehlt sich der Einsatz des **Parallux-Systems**. Zwar wird es in geringem Maße von einer veränderten Milchbeschaffenheit beeinflusst (erhöhte Zellzahl, veränderter pH-Wert), für den Einsatz von Milch anderer Tierarten ist es jedoch uneingeschränkt geeignet. Die Testdurchführung ist einfach, das Messinstrument aufgrund seiner Größe jedoch mehr für den Laboreinsatz als für den Einsatz auf einem Milchwagen konzipiert.

Mittels **Immunomat** sind elf Nachweise gleichzeitig durchführbar. Veränderte Milchbeschaffenheit beeinflusst dieses System kaum und es ist auf Milch anderer Tierarten anwendbar. Allerdings zeigt es Defizite im Nachweis einiger wichtiger Antibiotika (Penicillin G, Ampicillin) und neigt zu falsch-positiven Ergebnissen. Die Testdurchführung ist derzeit komplex, es besteht jedoch die Möglichkeit, eine Quantifizierung vorzunehmen. Es sollte auch bedacht werden, dass es sich hierbei um einen Prototyp handelt, an dem ständig Verbesserungen bezüglich der Testdurchführung und Funktionalität vorgenommen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, drei kommerziell erhältliche Testsysteme - Charm II, Charm ROSA (beide Charm Sciences Inc.) und Parallux (IDEXX Laboratories) - sowie einen Biosensor-Prototyp („Immunomat“) vergleichend auf ihre Fähigkeit hinsichtlich der Identifizierung antimikrobieller Rückstände in Milch zu überprüfen.

1. Funktionalität: Geräteaufwand und Testdurchführung waren beim Charm ROSA am einfachsten (Ein-Schritt-Test), beim Charm II am umfangreichsten. Für den Charm II wurde die längste (ca. 15-20 min), für den Immunomat die kürzeste Testdauer (ca. 3 min) ermittelt.

2. Testsensitivität und Testspezifität: Alle kommerziellen Testsysteme waren in der Lage, wichtige Antiinfektiva auf bzw. unterhalb der MRL-Werte aus VO (EWG) 2377/90 zu detektieren. Der Charm II erwies sich als sensibel und gruppenspezifisch, während Charm ROSA, Parallux und Immunomat nur einzelne Vertreter der Sulfonamide, Tetracycline und Chinolone erfassten. Der Immunomat wies zusätzlich Defizite im Nachweis wichtiger Beta-laktame auf (Penicillin G, Ampicillin), verfügte jedoch über die größte Nachweispalette.

3. Robustheit: Alle Systeme wurden durch extreme pH-Werte (< 6 bzw. > 8) beeinflusst, der Tetracyclin-Nachweis des Charm ROSA und der Penicillin G-Nachweis des Parallux zudem durch erhöhte Keim- bzw. Zellzahlen. Charm II und Parallux zeigten bei der Anwesenheit von Penicillinase falsch-positive Ergebnisse, Patentblau hingegen beeinträchtigte die Systeme Charm II und Parallux (Tetracyclin-Nachweise) sowie Charm ROSA (Sulfonamid-Nachweis).

4. Anwendbarkeit auf Milch anderer Tierarten: Für den Einsatz von Schaf- bzw. Ziegenmilch waren alle Testsysteme uneingeschränkt geeignet. Lediglich der Tetracyclin-Nachweis des Charm ROSA war für die Untersuchung von Kamelmilch nicht einsetzbar.

5. Validierung: Bei der Untersuchung BRT-positiver und -negativer Praxisproben erwies sich der Charm II als sensibel, Charm ROSA, Parallux und Immunomat hingegen erkannten BRT-positive Proben häufig nicht. Der Immunomat zeigte zudem einige falsch-positive Ergebnisse.

Keines der Systeme war in der Lage alle Testkriterien vollständig zu erfüllen, weshalb das passende System entsprechend der Fragestellung ausgewählt werden muss.

6 Summary

Identification of antimicrobials in milk using rapid test systems.

The aim of this study was to compare the ability of three commercially available test systems - Charm II, Charm ROSA (Charm Sciences Inc.) and Parallux (IDEXX Laboratories) - and a biosensor-prototype ("Immunomat") concerning the identification of antimicrobials in milk.

1. Functionality: The Charm ROSA had the most simple equipment and test procedure (one-step-assay), the Charm II the most extensive. The longest test duration was determined for the Charm II (approx. 15-20 min), the shortest for the Immunomat (approx. 3 min).

2. Sensitivity and selectivity: All commercially available test systems were able to detect important drugs at MRL-level or below. Charm II was the most sensitive and non-specific test, Charm ROSA, Parallux and Immunomat were rather specific in detecting sulfonamides, tetracyclines and quinolones. The Immunomat showed poor sensitivity for some major beta-lactams (penicillin G, ampicillin), yet it provides the largest number of different assays.

3. Ruggedness: All systems were affected by extreme changes of pH-values. Increased bacteria and somatic cell counts had an influence on Charm ROSA (tetracycline assay) and Parallux (penicillin G assay). Charm II and Parallux showed some false-positives at the presence of penicillinase, patent blue interferes Charm II, Parallux (tetracycline assay) and Charm ROSA (sulfa drug assay).

4. Possible use on milk of various animals: All systems were suitable for the use on ewes and goat's milk, the tetracycline assay of Charm ROSA was not applicable to analyzing camel's milk.

5. Validation: Analyzing BRT-positive and BRT-negative samples the Charm II was very sensitive. Charm ROSA, Parallux and Immunomat were often not able to recognize positive samples. The Immunomat showed some false-positive results.

None of the systems could completely fulfil all test criteria, thus the choice of the adequate test system should strongly depend on its intended use.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AGNELLI, F., J. SUCHECK, K. MARBY, D. RABUKA, S. YAO, P. SEARS, F. LIANG und C. WONG (2004):
Dimeric aminoglycosides as antibiotics
Angew. Chem. Int. Ed. 43, 1562-1566

AIM (Analytik in Milch GmbH), München (2002):
Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT), Agar-Diffusions-Verfahren zum Nachweis von Hemmstoffen und Tierarzneimittel-Rückständen in Milch und Milchprodukten
Produktinformation

ALTHAUS, R. L., M. P. MOLINA, M. RODRIGUEZ und N. FERNANDEZ (2001):
Detection limits of β-lactam-antibiotics in ewe milk by penzym enzymatic test
J. Food Prot. 64, 1844-1847

ALTHAUS, R., A. TORRES, C. PERIS, M. C. BELTRAN, N. FERNANDEZ und M. P. MOLINA (2003):
Accuracy of BRT and delvotest microbial inhibition tests as affected by composition of ewe's milk
J. Food Prot. 66, 473-478

ANDERSON, K. L., W. A. MOATS, J. E. RUSHING, D. P. WESEN und M. G. PAPICH (1995):
Potential for Oxytetracycline administration by three routes to cause milk residues in lactating cows, as detected by radioimmunoassay (Charm II) and high-performance liquid chromatography test methods
Am. J. Vet. Res. 56, 70-77

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

BAIRD, C. und D. G. MYSZYKA (2002):
Review: Current and emerging commercial optical biosensors
J. Mol. Recognit. 14, 261-268

BARBOSA, M., G. SUHREN und R. BEUKERS (2004):
Suitability and application of available test kits for the detection of residues of antimicrobials in milk from species other than the cow - a review
IDF-Bull. 390, 30-40

BECKER, F. (1988):
Gewinnung und Verarbeitung von Schaf- und Ziegenmilch in Österreich
Dtsch. Molkerei-Zg. 109, 903-906

BEYER, F. (1986):
Hemmstoffe in Milch aus technologischer Sicht
Dtsch. Molkerei-Zg. 107, 898-899

BICKNÄSE, A. und C. GUHLMANN (2005):
Exotische Lebensmittel tierischer Herkunft: Kamelmilch
http://www-proj.loel.hs-anhalt.de/oeko/bueffel_kamelmilch/top2.htm (Stand: 21.09.2005)

BFT (2004):
Tiergesundheit im Blickpunkt 45

BLACKMORE, D. J., R. JACKMAN und J. A. MORRIS (1988):
Method for the production of antigenic protein-hapten conjugates and antibodies corresponding thereto
Patent Publication No. EP 0 309 299 A 1

BLANCA, M., C. MAYORGA, M. J. TORRES, R. WARRINGTON, A. ROMANO, P. DEMOLY, F. SILVIU-DAN, M. MOYA, J. FERNANDEZ und C. JUÁREZ (2002):
Review: Side-chain-specific reactions to betalactams: 14 years later
Clin. Exp. All. 32, 192-197

CACCIATORE, G., M. PETZ, S. RACHID, R. HAKENBECK und A. A. BERGWERFF (2004):
Development of an optical biosensor assay for detection of β-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2 x
Anal. Chim. Acta 520, 105-115

CARLSSON, A. und L. BJÖRCK (1991):
Charm Test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assays in herd milk
J. Food Prot. 54, 32-36

CARLSSON, A. und L. BJÖRCK (1992):
Liquid chromatography verification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assays and the Charm II Test
J. Food Prot. 55, 374-378

CARLSSON, A., L. BJÖRCK und G. JOHNSSON (1992):
The use of different microbial assays in combination with the Charm II Test in the detection of antibiotic residues in herd milk
Int. Dairy J. 2, 109-119

CARS, O., S. MÖLSTAD und A. MELANDER (2001):
Variation in antibiotic use in the European Union
The Lancet 357, 1851-1853

CASALTA, E., J.-P. DUBEUF, G. KALANTZOPOULOS, A. LAURET, A. PIRISI, T. TRUJILLO und V. VALLERAND (2004):
Characteristics of sheep and goat milks-quality and hygienic factors fort he sheep and goat dairy sectors
IDF-Bull. 390, 16-28

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

CERNIGLIA, C. E. und S. KOTARSKI (1999):
Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora
Reg. Toxicol. Pharmacol. 29, 238-261

CHARM SCIENCES INC., Malden/USA (o. J. a):
Charm II Test for beta-lactams in milk using tablet reagents (Operators Manual)
Produktinformation

CHARM SCIENCES INC., Malden/USA (o. J. b):
Charm II Test for tetracyclines in milk using tablet reagents (Operators Manual)
Produktinformation

CHARM SCIENCES INC., Malden/USA (2000):
Charm II beta-lactam test for maximum residue limits (MRL) (Operator`s Manual for Milk)
Produktinformation

CHARM, S. E. und R. CHI (1988):
Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 304-316

CHOPRA, I. und M. ROBERTS (2001):
Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 232-260

CONTRERAS, A., M. J. PAAPE, A. L. DI CARLO, R. H. MILLER und P. RAINARD (1997):
Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats
J. Dairy Sci. 80, 1113-1118

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

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1998):
The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins
Analyst 123, 2749-2754

DOMAGK, G. (1935):
Ein Beitrag zur Chemotherapie bakterieller Infektionen
Dtsch. Med. Wschr. 7, 250-256

EIBERLE, M. K. (2004):
Optimierung eines microarraybasierten Sensorsystems für die Detektion von Antibiotika in Milch
Diplomarbeit, Inst. f. Wasserchemie, TU München

FARAH, Z. und A. FISCHER (2004):
Milk and meat from the camel
vdf Hochschulverlag AG, Zürich, ISBN 3-7281-2527-X (2004)

FEDESA (European Federation of Animal Health) (1998):
Facts and figures about the European animal health industry
Dossier Nr. 14, Brüssel

FERNANDEZ-RIVAS, M., C. P. CARRAL, M. CUEVAS, C. MARTI, A. MORAL und C. J. SENENT (1995):
Selective allergic reactions to clavulanic acid
J. Allergy Clin. Immunol. 95, 748-750

FLEMING, A. (1929):
On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*
Br. J. Exp. Pathol. 10, 226-236

FLOSS, M. (1997):
Anwendung enzymimmunochemischer Testsysteme zum Nachweis von Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation
Diss. med. vet. München

GANGWER, M., HANSEN, D. und BODYFELT, F. (1994):
On-farm screening tests for beta-lactam residues in milk
A Pacific Northwest Extension Publication, Oregon/Washington/Idaho Nr. 455

GARDNER, I. A., J. S. CULLOR, F. D. GALEY, W. SISCHO, M. SALMAN, B. SLENNING, H. N. ERB und J. W. TYLER (1996):
Alternatives for validation of diagnostic assays used to detect antibiotic residues in milk
JAVMA 209, 46-52

GÄRTNER, A., A. STRASSER, R. DIETRICH und E. MÄRTLBAUER (2004):
Entwicklung eines Enzymimmuntest zum Nachweis von Chinolonen
in: 45. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Patenkirchen, Tagungsbericht

GAUDIN, V., J. FONTAINE und P. MARIS (2001):
Screening of penicillin residues in milk by surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic pre-treatment
Anal. Chim. Acta 436, 191-198

GOOTZ, T. D. (1990):
Discovery and development of new antimicrobial agents
Clin. Microbiol. Rev. 3, 13-31

GRUNWALD, L. und M. PETZ (2003):
Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt
Anal. Chim. Acta 483, 73-79

GUSTAVSSON, E. (2003):
SPR biosensor analysis of β-lactam antibiotics in milk
Doctorial thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

GUSTAVSSON, E. und A. STERNESJÖ (2004):
Biosensor analysis of β-lactams in milk: comparison with microbiological, immunological and receptor-based screening methods
J. AOAC Int. 87, 614-620

GUSTAVSSON, E., P. BJURLING und A. STERNESJÖ (2002a):
Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity
Anal. Chim. Acta 468, 153-159

GUSTAVSSON, E., P. BJURLING, J. DEGELAEN und A. STERNESJÖ (2002b):
Analysis of β-lactam antibiotics using a microbial receptor protein-based biosensor assay
Food Agric. Imm. 14, 121-131

HAASNOOT, W. und R. VERHEIJEN (2001):
A direct (non-competitive) immunoassay for gentamicin residues with an optical biosensor
Food Agric. Imm. 13, 131-134

HAASNOOT, W., E. E. M. G. LOOMANS, G. CAZEMIER, R. DIETRICH, R. VERHEIJEN, A. A. BERGWERFF und R. W. STEPHANY (2002):
Direct versus competitive biosensor immunoassays for the detection of (dihydro) streptomycin residues in milk
Food Agric. Imm. 14, 15-27

HEESCHEN, W. (1993):
Entwicklung eines integrierten Systems zum Nachweis von Antibiotika, Sulfonamiden und "Hemmstoffen" in Milch
Die Molkereizeitung 47, 1101-1104

HEESCHEN, W. und G. SUHREN (1996):
Principles of and practical experience with an integrated system fort he detection of antimicrobials in milk
Milchwiss. 51, 154-159

HOMOLA, J., S. S. YEE und G. GAUGLITZ (1999):
Surface plasmon resonance sensors: review
Sensors and Acuators B 54, 3-15

HUTH, S. P., P. S. WARHOLIC, J. M. DEVOU, L. K. CHANEY und G. H. Clark (2002):
Parallux™ beta-lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephapirin and ceftiofur in bovine milk
J. AOAC Int. 85, 355-364

IDEXX LABORATORIES INC. (2002):
Innovators in residue testing
PowerPoint-Präsentation zu Verkaufs- und Demonstrationszwecken

JAGLAN, P. S., F. S. YEIN, R. E. HORNISH, B. L. COX, T. S. ARNOLD, R. D. ROOF und T. J. GILBERTSON (1992):
Depletion of intramusculary injected ceftiofur from the milk of dairy cattle
J. Dairy Sci. 75, 1870-1876

JUNG, C. (1996):
Rückstandskontrolle mit Schnellmethoden
Deutsche Milchwirtschaft 47, 543-544

KAPPELER, S. (1998):
Strukturelle und quantitative Unterschiede zwischen Kamel- und Kuhmilchproteinen
Diss. techn. sci., Technische Universität Zürich

KATLA, A-K., H. KRUSE, G. JOHNSON und H. HERIKSTAD (2001):
Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products
Int. J. Food Microbiol. 67, 147-152

KOSHY, T. und A. R. CAZERS (1997):
Controlled hydrolysis of ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin; isolation and identification of hydrolysis products
J. Pharmaceut. Sci. 86, 389-395

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

KROKER, R., R. SCHERKL und F. R. UNGEMACH (2002):
Chemotherapie bakterieller Infektionen
in: FREY, H.-H. und W. LÖSCHER: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, pp. 353-393
Enke Verlag, Stuttgart

KROLL, S. (2000):
Zur Eignung von Schnelltestverfahren zum Rückstandsnachweis von Beta-laktam-Antibiotika in Milch
Diss. med. vet. München

LATHERS, C. M. (2001):
Role of veterinary medicine in public health: antibiotic use of food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance
J. Clin. Pharmacol. 41, 595-599

LEGG, D. R., A. BAUMGARTNER, R. SALTER und A. WHEELER (2003):
ROSA (rapid one step assay) for antibiotics in honey
APIACTA 38, 207-217

LESHER, G. Y., E. J. FROEHLICH, M. D. GRUETT, J. H. BAILEY und R. P. BRUNDAGE (1962):
1,8-naphthyridine derivates. A new class of chemotherapeutic agents
J. Med. Pharmaceut. Chem. 5, 1063-1068

MACNEIL, J. D., G. O. KORSRUD, J. O. BOISON, M. G. PAPICH und W. D. G. YATES (1991):
Performance of five screening tests for the detection of penicillin G residues in experimentally injected calves
J. Food Prot. 54, 37-40

MARK, P. und A. SCHÖNE (2000):
Ziegen- und Schafmilch - Wissenswertes und Informationsquellen aus dem Internet
Dtsch. Molkerei-Zg. 121, 448-454

MÄRTLBAUER, E. (1995):
Die Hemmstoffproblematik aus der Sicht der Analytik
Milchwirtschaftliche Berichte 124, 115-119

MÄRTLBAUER, E., E. USLEBER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994):
Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides
Analyst 119, 2543-2548

MELLGREN, C. und A. STERNESJÖ (1998):
Optical immunosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk
J. AOAC Int. 81, 394-397

MELLO, L. D. und L. T. KUBOTA (2002):
Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries
Food Chemistry 77, 237-256

MILCHPRÜFRING E.V. (2002):
Tätigkeitsbericht 2002

MILCHPRÜFRING E.V. (2005):
Jahresvergleich 2004/2005

MITCHELL, J. M., M. W. GRIFFITHS, S. A. MCEWEN, W. B. MCNAB und A. J. YEE (1998):
Review: antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance
J. Food Prot. 61, 742-756

MOATS, W. A., K. L. ANDERSON, J. E. RUSHING und D. P. WESEN (1995):
Comparison of a radioimmunoassay (Charm II) test with high-performance liquid chromatography for detection of oxytetracycline residues in milk samples from lactating cattle
Am. J. Vet. Res. 56, 795-800

MOLINA, A., M. P. MOLINA, R. L. ALTHAUS und L. GALLEGO (2003):
Residue persistence in sheep milk following antibiotic therapy
Vet. J. 165, 84-89

MOLINA, M. P., R. L. ALTHAUS, A. MOLINA und N. FERNANDEZ (2003a):
Antimicrobial agent detection in ewes milk by the microbial inhibitor test brilliant black reduction test - BRT AiM®
Int. Dairy J. 13, 821-826

MOLINA, M. P., R. L. ALTHAUS, S. BALASCH, A. TORRES, C. PERIS und N. FERNANDEZ (2003b):
Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk
J. Dairy Sci. 86, 1947-1952

MORRIS, A. K. und R. G. MASTERSON (2002):
Antibiotic resistance surveillance: action for international studies
J. Antimicrob. Chem. 49, 7-10

MUSSER, J. M. B. und K. L. ANDERSON (1999):
Using drug residue screening tests to investigate contamination of milk
Vet. Med. 94, 474-479

NEAVES, P. (1999):
Monitoring antibiotics in milk - the changing world of test methods
British Mastitis Conference 1999 (Institute for Animal Health)

OKERMAN, L., K. DE WASCH und J. VAN HOOF (2000):
An inhibition test intended to detect and to differentiate between penicillins, cephalosporins, tetracyclines and quinolones, for use in muscle tissue from different animal species
in: van GINKEL, L.A. und A. RUITER: Euro Residue IV: conference on residues of veterinary drugs in food, pp. 802-808

OKERMAN, L., K. DE WASCH und J. VAN HOOF (2003):
Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and in porcine kidneys by solid-phase fluorescence immunoassay
J. AOAC Int. 86, 236-340

OTTEN, H., M. PLEMPEL und W. SIEGENTHALER (1975):
Antibiotika-Fiebel, 4. Auflage, pp. 110-406
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

PATEL, P. D. (2002):
(Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review
Tac-Trends in Analytical Chemistry 21, 96-115

RAND, A. G., J. YE, C. W. BROWN und S. V. LETCHER (2002):
Optical biosensors for food pathogen detection
Food Tech. 56, 32-39

RETSEMA, J. und W. FU (2001):
Macrolides: structures and microbial targets
Int. J. Antimicrob. Agents 18, S 3-S 10

RESTANI, P., A. GAIASCHI, A. PLEBANI, B. BERETTA, G. CAVAGNI, A. FIOCCHI, C. POIESI, T. VELONA, A. G. UGAZIO und C. L. GALLI (1999):
Cross-reactivity between milk proteins from different animal species
Clin. Exp. Allergy 29, 997-1004

REYBROECK, W. (2002):
Evaluation of the Parallux Test for the detection of β-lactam antibiotics, sulphonamides and tetracyclines
4th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 4.-7. Juni 2002, Antwerpen (Belgien)

REYBROECK, W. und S. OOGHE (2002):
Results of a multilaboratory trial regarding rapid tests for the control of milk on β-lactam antibiotics
4th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 4.-7. Juni 2002, Antwerpen (Belgien)

ROHNER, P., M. SCHÄLLIBAUM und J. NICOLET (1985):
Detection of penicillin G and ist benzylpenicilloyl (BPO)-derivates in cow milk and serum by means of an ELISA
J. Food Prot. 48, 59-62

ROMANO, A., C. MAYORGA, M. J. TORRES, M. C. ARTESANI, R. SUAU, F. SANCHEZ, E. PEREZ, A. VENUTI und M. BLANCA (2000):
Immediate allergic reactions to cephalosporine: Cross-reactivity and selective response
J. Allergy Clin. Immunol. 106, 1177-1183

SALTER, R. S., D. LEGG, N. OSSANNA, C. BOYER, J. SCHEEMAKER, P. MARKOVSKY und S. J. SAUL (2001):
Charm safe-level beta-lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephapirin and penicillin G in raw commingled milk
J. AOAC Int. 84, 29-36

SCHIELKE, J. (1993):
Eignung des mikrobiellen, radioaktiven Rezeptortests, bzw. radioaktiven Immuntests Charm II in der Milchwirtschaft zur Untersuchung von Antibiotikarückständen in Rohmilchproben
Diplomarbeit, Georg-Simon-Ohm Fachhochschule Nürnberg

SCHIFFMANN, A. P., M. SCHUETZ und H. WIESNER (1992):
False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. 1. The influence of antibiotic residues in bulk milk on lactic acid production of starter cultures
Milchwiss. 47, 712-715

SCHWARZ, S. und E. CHASLUS-DANCLA (2001):
Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance
Vet. Res. 32, 201-225

SCHWARZ, S., C. KEHRENBERG und T. R. WALSH (2001):
Review: Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production
Int. J. Antimicrob. Agents 17, 431-437

SCHULZE, S. R. (2002):
Zum Nachweis von Hemmstoffen und Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen- und Stutenmilch
Diss. med. vet. München

SENYK, G. F., J. H. DAVIDSON, J. M. BROWN, E. R. HALLSTEAD und J. W. SHERBON (1990):
Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk
J. Food Prot. 53, 158-164

SITU, C. und C. T. ELLIOTT (2005):
Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay
Anal. Chim. Acta 529, 89-96

STAHLMANN, R. und H. LOBE (2005)
Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie
in: AKTORIES, K., U. FÖRSTERMANN, F. HOFFMANN und K. STARKE: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, pp. 781-911
Elsevier Urban und Fischer Verlag, München/Jena

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

STRASSER, A. (2003):
Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch-Herstellung der immunchemischen Komponenten
Diss. med. vet. München

STRASSER, A., R. DIETRICH, E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (2003):
Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten-glucose oxidase conjugates
Anal. Chim. Acta 495, 11-19

STRASSER, A., K.-J. ZAADHOF, V. EBERLEIN, U. WERNERY und
E. MÄRTLBAUER (2005):
Detection of antimicrobial residues in camel milk - suitability of various commercial microbial inhibitor tests as screening tests
eingereicht in Milchwiss.

SUHREN, G. (1996):
Mikrobiologischer Hemmstofftest mit *E. coli* zum Nachweis von Chinolon-Rückständen in Milch
in: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht pp. 659-664

SUHREN, G. (2002):
Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch - rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 54, 35-73

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1987):
Entwicklungen zum Antibiotika-Nachweis in Milch
Dtsch. Molkerei-Zg. 48, 1566-1570

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998):
Nachweis von β-laktamantibiotikarückständen in Milch - Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest
Dtsch. Molkerei-Zg. 14, 674-681

SUHREN, G. und H-G. WALTE (2003):
Experiences with the application of method combinations fort he detection of residues of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers
Milchwiss. 58, 536-540

SUHREN, G., P. HAMMER und W. HEESCHEN (1994):
Hemmstoffe, Antibiotika und Sulfonamide
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 46, 237-246

SUHREN, G., P. HAMMER und W. HEESCHEN (1996):
Detection of residues of quinolones in milk
in: HAAGSMA, N. und A. RUITER: Euroresidue III: conference on residues of veterinary drugs in food, pp. 917-921

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

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

TORRES, M. J., M. BLANCA, J. FERNANDEZ, A. ROMANO, A. DE WECK, W. ABERER, K. BROCKOW, W. J. PICHLER und P. DEMOLY (2003):
Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics
Allergy 58, 961-972

TSAI, C.-E. und F. KONDO (2001):
Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents
J. Food Prot. 64, 361-366

WALSH, C. (2000):
Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance
Nature 406, 775-781

WARRINGTON, R. und S. MCPHILLIPS (1996):
Independent anaphylaxis to cefazolin without allergy to other β-lactam antibiotics
J. Allergy Clin. Immunol. 98, 460-462

WEBB, S., T. TERNES, M. GIBERT und K. OLEJINICZAK (2003):
Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water
Tox. Letters 142, 157-167

WEGENER, H. C. (2003):
Antibiotics in animal feed and their role in resistance development
Curr. Opin. Microbiol. 6, 439-445

WERNERY, U. (2003):
New observations on camels and their milk
Dar Al Fajr Printing and Publishing, Abu Dhabi, United Arab Emirates

WERNERY, U. und R. WERNERY (2001):
Camelidae
Dar Al Fajr Printing and Publishing, Abu Dhabi, United Arab Emirates

WIERUP, M. (2000):
The control of microbial diseases in animals: alternatives to the use of antibiotics
Int. J. Antimicrob. Agents 14, 315-319

WILLIAMS, J. D. (1999):
β-lactamases and β-lactamase inhibitors
Int. J. Antimicrob. Agents 12, Suppl. 1, S 3-S 7

WOODWARD, K. N. (1991):
Hypersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs
Vet. Hum. Toxicol. 33, 168-172

ZAADHOF, K.-J., S. SCHULZE und E. MÄRTLBAUER (2004):
Applicability of various microbial inhibitor tests as screening tests for the presence of antimicrobials in goat and ewe milk
Milchwiss. 59, 179-183

ZAADHOF, K.-J., E. MÄRTLBAUER, A. STRASSER und S. SCHULZE (2005):
Nachweis von Hemmstoffen in Milch verschiedener Tierarten
Dtsch. Molkerei-Zg. 19, 27-29

ZENG, S. S., S. HART, E. N. ESCOBAR und K. TESFAI (1998):
Validation of antibiotic residue tests for dairy goats
J. Food Prot. 61, 344-349

ZOEMER, E., R. SALTER, D. LEGG, J. L. SCHEEMAKER, L. PLUMLEY und S. E. CHARM (1993):
Charm II tests: an important tool in the modern integrative monitoring system for all common antimicrobial drugs in livestock products
in: HAAGSMA, N., A. RUITER und P. B. CZEDIK-EYSENBERG: Euro Residue II: conference of residues of veterinary drugs in food, pp. 706-709

ZWALD, A. G., P. L. RUEGG, J. B. KANEENE, L. D. WARNICK, S. J.WELLS, C. FOSSLER und L. W. HALBERT (2004):
Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms
J. Dairy Sci. 87, 191-201

Zitierte Gesetze, Verordnungen und amtliche Untersuchungsverfahren

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vom 26. Juni 1990. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft 1990, L 224, 1. Zuletzt geändert durch VO (EWG) Nr. 0712/05 vom 11.05.05 der Kommission

Verordnung (EWG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29.04.2004 über Lebensmittelhygiene. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 139

Verordnung (EWG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29.04.2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 139

Verordnung (EWG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29.04.2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 139

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz **LMBG**) in der Fassung vom 09.09. 1997 (BGBl. I, 2296), zuletzt geändert durch Änderungsverordnung vom 08.08.2002 (BGBl I, 3116)

Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz **AMG**) in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung des Arzneimittelgesetzes vom 17.08.2002 (BGBl. I, 60), zuletzt geändert durch Änderungsverordnung vom 30.06.2004 (BGBl I, 2031)

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (**Milchverordnung**) vom 20.06.00 (BGBl I, 36), zuletzt geändert durch Änderungsverordnung vom 12.11.04 (BGBl I, 2794)

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (**Milch-Güte-Verordnung**) vom 09.07. 1980 (BGBl I, 878), zuletzt geändert durch die Änderungsverordnung vom 30.10.2003 (BGBl I, 2170)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG:

Nachweis von Hemmstoffen in Milch - Agar-Diffusionsverfahren (Blättchentest) (L 01.00-6)

Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch. Agar-Diffusionsverfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest) (L 01.01-5)

Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch. Agar-Diffusionsverfahren mit *Bacillus stearothermophilus* (Brilliantschwarz-Reduktionstest) (L 01.00-11)

Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Tropfplatten-Verfahren) (L 06.00-19)

Analyse- und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelter Milch. Anhänge I und II der Entscheidung der Kommission vom 14.02.1991 zur Festlegung bestimmter Analyse- und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch. VIII. Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden (L 01.00-51)

DANKSAGUNG

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

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Angelika Strasser für die hervorragende Betreuung bedanken. Ihre zahlreichen Anregungen, ihre große Sorgfalt bei der Durchsicht und nicht zuletzt ihre unermessliche Geduld waren mir während der Anfertigung dieser Arbeit eine große Hilfe.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts, besonders an Frau Lia Schweizer, deren große Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Mitarbeitern des Instituts für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Charm Sciences Inc. (USA) bzw. MCS Diagnostics (Niederlande) und IDEXX Laboratories (USA) für die Bereitstellung von Material und Geräten. Hierbei gilt mein besonderer Dank Herrn Robert Salter von Charm Sciences Inc., Herrn Hay Thijssen von MCS Diagnostics und Frau Sonja Herterich von IDEXX Laboratories für die investierte Zeit und Hilfe.

Ebenfalls danken möchte ich den Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsgutes der Tierärztlichen Fakultät für die freundliche Hilfe bei der Beschaffung von Probenmaterial.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Vater Winfried für seine Unterstützung, bei meiner Mutter Friederike und meiner Schwester Gabi für ihre Motivation und bei meinem Freund Bastian für seine unermüdliche Geduld herzlich bedanken.

Lebenslauf

Brigitte Quandt	geboren am 01. März 1979 in Amberg
Eltern:	Friederike Quandt, geb. Wagner Winfried Quandt
Schulbildung:	1986-1990 Besuch der Grundschule in Hamburg, Ulm und Leavenworth, Kansas (USA) 1990-1998 Besuch des Gymnasiums in Sigmaringen und Heidelberg
Studium:	1998-2004 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München
Staatsexamen:	09.März 2004
Approbation:	26. April 2004
Berufliche Tätigkeit:	April 2004 Beginn des Promotionsstudiums Januar 2005 bis Oktober 2005 wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität München