

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

---

**Untersuchungen zum Vorkommen von Antiinfektiva  
in bayerischer Konsum- und Tankmilch**

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

von  
**Peter Duelli**  
aus  
Überlingen

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer  
Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Neubauer-Juric

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

*Meinen beiden  
Frauen in Liebe gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Antibiotika- und Sulfonamid-Rückstände in der Milch.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Allgemeines.....	3
2.1.2	Einsatz von Antibiotika und Sulfonamiden in der Veterinärmedizin .....	4
2.1.3	Gesundheitliche Risiken.....	5
2.1.4	Lebensmitteltechnologische Bedeutung.....	7
2.1.5	Rückstände in Milch.....	8
2.1.6	Rechtliche Grundlagen.....	13
<b>2.2</b>	<b>Charakteristika wichtiger Antiinfektiva.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Allgemeines.....	16
2.2.2	Penicilline.....	17
2.2.2.1	<i>Allgemeines .....</i>	<i>17</i>
2.2.2.2	<i>Struktur und Synthese.....</i>	<i>17</i>
2.2.2.3	<i>Pharmakodynamik und Pharmakokinetik .....</i>	<i>18</i>
2.2.2.4	<i>Therapeutische Anwendung beim Rind.....</i>	<i>20</i>
2.2.2.5	<i>Resistenzlage .....</i>	<i>21</i>
2.2.3	Aminoglykosidantibiotika.....	21
2.2.3.1	<i>Allgemeines .....</i>	<i>21</i>
2.2.3.2	<i>Struktur und Synthese.....</i>	<i>21</i>
2.2.3.3	<i>Pharmakokinetik.....</i>	<i>23</i>
2.2.3.4	<i>Therapeutische Anwendung beim Rind.....</i>	<i>23</i>
2.2.3.5	<i>Resistenzlage .....</i>	<i>24</i>
2.2.4	Tetracycline.....	24
2.2.4.1	<i>Allgemeines .....</i>	<i>24</i>
2.2.4.2	<i>Struktur und Synthese.....</i>	<i>25</i>
2.2.4.3	<i>Pharmakokinetik.....</i>	<i>26</i>
2.2.4.4	<i>Therapeutische Anwendung beim Rind.....</i>	<i>26</i>
2.2.4.5	<i>Resistenzlage.....</i>	<i>27</i>

2.2.5	Chinolone .....	27
2.2.5.1	<i>Allgemeines</i> .....	27
2.2.5.2	<i>Struktur und Synthese</i> .....	27
2.2.5.3	<i>Pharmakokinetik</i> .....	28
2.2.5.4	<i>Therapeutische Anwendung beim Rind</i> .....	29
2.2.5.5	<i>Resistenzlage</i> .....	30
2.2.6	Sulfadiazin.....	30
2.2.6.1	<i>Allgemeines</i> .....	30
2.2.6.2	<i>Struktur und Synthese</i> .....	31
2.2.6.3	<i>Pharmakokinetik</i> .....	32
2.2.6.4	<i>Therapeutische Anwendung beim Rind</i> .....	32
2.2.6.5	<i>Resistenzlage</i> .....	33
<b>2.3</b>	<b>Nachweisverfahren</b> .....	<b>33</b>
2.3.1	Allgemeines.....	33
2.3.2	Immunologische Verfahren.....	36
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b> .....	<b>42</b>
3.1.1	Chemikalien und Biochemika .....	42
3.1.2	Antibiotika und Sulfonamide .....	42
3.1.3	Puffer und Lösungen .....	43
3.1.4	Immunreagenzien .....	43
3.1.5	Geräte und Instrumente .....	46
3.1.6	Verbrauchsmaterialien .....	46
<b>3.2</b>	<b>Methodik</b> .....	<b>47</b>
3.2.1	Probenmaterial und Aufbereitung .....	47
3.2.2	Enzymimmunologische Nachweise .....	50
3.2.2.1	<i>Allgemeines</i> .....	50
3.2.2.2	<i>Enzymimmunologischer Nachweis von Fluorchinolonen</i> .....	52
3.2.2.3	<i>Enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen, Cloxacillin, Gentamicin, Neomycin und Streptomycin</i> .....	54
3.2.2.4	<i>Enzymimmunologischer Nachweis von Sulfadiazin</i> .....	56
3.2.2.5	<i>Enzymimmunologischer Nachweis von Penicillinen</i> .....	56

3.2.3	Immunaффinitätschromatographie (IAC) für den Nachweis von Cloxacillin und Sulfadiazin .....	56
3.2.4	Mikrobiologischer Nachweis mittels BRT-MRL-Suchtest.....	59
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchungen von Milchproben sowie Auswertung wichtiger Testparameter.....</b>	<b>60</b>
3.3.1	Nachweis von Fluorchinolonen.....	60
3.3.2	Nachweis von Cloxacillin .....	62
3.3.3	Nachweis von Aminoglykosidantibiotika .....	65
3.3.3.1	<i>Nachweis von Gentamicin.....</i>	<i>66</i>
3.3.3.2	<i>Nachweis von Neomycin.....</i>	<i>68</i>
3.3.3.3	<i>Nachweis von Streptomycin .....</i>	<i>69</i>
3.3.4	Nachweis von Tetracyclinen .....	71
3.3.5	Nachweis von Sulfadiazin.....	73
3.3.6	Auswertung des BRT-Verfahrens .....	75
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

10 % MM	in A. dest. rekonstituiertes Magermilchpulver (10 % g/v)
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
BSA	Bovines Serumalbumin
DASP	Doppelantikörpertechnik (Double Antibody Solid Phase)
EIA	Enzymimmunoassay
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
IAC	Immunaффinitätschromatographie
mAk	monoklonaler Antikörper
MRL	maximale Rückstandsmenge (Maximum Residue Limit)
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
VK	Variationskoeffizient

Weitere Abkürzungen, die Angaben in Tabellen und Abbildungen betreffen, werden im direkten Umfeld der jeweiligen Darstellung erläutert.

# 1 Einleitung

Die Milcherzeugung stellt gerade in der bayerischen Landwirtschaft die wichtigste Einnahmequelle für die Landwirte dar. Nach Angaben der Landesvereinigung der bayerischen Milchwirtschaft e.V. lieferten im Dezember 2006 rund 47.205 Erzeuger in Bayern Milch an die Molkereien ab. Diese wiederum erzielten mit dem Verkauf ihrer Produkte über ein Drittel des Gesamtumsatzes des produzierenden Ernährungsgewerbes. Damit stellt der Rohstoff Milch einen bedeutenden Wirtschaftsfaktor dar, der zur Sicherung der Qualität strengen lebensmittelhygienischen Kriterien unterliegt. Zur Einhaltung dieser Kriterien wird die Milch im Rahmen der Milchgüte-VO bei der Abholung vom Erzeuger (Anlieferungsmilch) regelmäßig auf Hemmstoffe untersucht. Auf der Grundlage dieser Untersuchungsergebnisse und anderer Parameter wie Fettgehalt, Keim- bzw. Zellzahl erfolgt eine Qualitätseinstufung der Milch und damit verbunden die Festlegung des Auszahlungspreises. Untersuchungen der Tankmilch in den Molkereien vor der Weiterverarbeitung des Rohstoffes Milch verhindern zum einen, dass es in Folge von Rückständen zu Fehlproduktionen kommt und so große wirtschaftliche Verluste entstehen, zum anderen wird auch der Verbraucher vor möglichen gesundheitlichen Schäden durch den Konsum arzneimittelhaltiger Milch bewahrt. Durch diese Hemmstoffuntersuchungen erfüllt die Molkerei auch die lebensmittelhygienischen Bestimmungen der VO (EG) 853/2004.

In den meisten Fällen werden die Untersuchungen auf Arzneimittelrückstände in Form von Screenings mit mikrobiologischen Testsystemen durchgeführt, da diese im Vergleich zu anderen Methoden kostengünstig und einfach durchzuführen sind. Mikrobiologische Verfahren können zwar  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sehr sensitiv nachweisen, sprechen aber auf die meisten anderen Wirkstoffgruppen erst bei Konzentrationen über den erlaubten Rückstandshöchstmengen an.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Gesamtüberblick über die Rückstandssituation in bayerischer Milch unter besonderer Berücksichtigung der in der tierärztlichen Rinderpraxis bevorzugt eingesetzten Antibiotika und Sulfonamide zu erhalten. Die Untersuchung auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgte mittels handelsüblicher mikrobiologischer Tests. Zum Nachweis anderer, von diesen Tests nur ungenügend erfasster Wirkstoffe wurden spezifische enzymimmunologische Verfahren eingesetzt. Aufgrund der hohen Sensitivität dieser

Verfahren war es möglich, Rückstände von Antiinfektiva im Spurenbereich z. T. weit unter den gesetzlich festgelegten Höchstmengen nachzuweisen und somit speziell im Rahmen der Untersuchung von Konsummilch Hinweise auf potentielle Risikobereiche zu erhalten.

## **2           Schrifttum**

### **2.1           Antibiotika- und Sulfonamid-Rückstände in der Milch**

#### **2.1.1       Allgemeines**

Anlieferungsmilch muss gem. § 2 der Milchgüteverordnung (Milchgüte-VO) mindestens zweimal im Monat auf Hemmstoffe untersucht werden. Positive Hemmstoffbefunde, die in der Regel durch eine postsekretorische Kontamination mit Desinfektionsmitteln oder durch Rückstände von antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln verursacht werden, sind zu 97 % auf Managementfehler zurückzuführen (KRÖMKER, 2007). Sehr häufig liegt dabei die Ursache in Defiziten bei der Melkhygiene wie die Nichtbeachtung der Melkreihenfolge, oder einer ungenügenden Reinigung des Melkgeschirrs. Oftmals wird auch nach der intramammären Behandlung eines Euterviertels die Milch der anderen Viertel an die Molkereien abgegeben. Hauptsächlich werden allerdings Fehler im Rahmen der Behandlung, wie die Nichtbeachtung von Wartezeiten, die Applikation von Trockenstell-Präparaten während der Laktation oder die Überdosierung von Arzneimitteln für auftretende Rückstände verantwortlich gemacht (SCHÄLLIBAUM, 1990; KIRST, 1992, EDMONDSON, 2003). Für die Häufigkeit von Arzneimittelrückständen spielt auch die Eutergesundheit eine maßgebliche Rolle. So werden beispielsweise im Sommer bedingt durch eine höhere Krankheitsanfälligkeit der Tiere infolge von Hitzestress und einem erhöhten Keimdruck auch mehr positive Hemmstofffälle registriert als in anderen Monaten (BAUMGARTNER, 2006).

Grundsätzlich treten Rückstände von antimikrobiell wirksamen Substanzen in der Milch vor allem nach intrazisternalen Applikationen auf. Danach folgen in absteigender Reihenfolge parenterale, intrauterine und orale Verabreichungen (GRAVERET, 1983). In Einzelfällen sollen auch dadurch Rückstände von Antiinfektiva in die Milch gelangt sein, dass Kühe aus antibiotikahaltigen Klauenbädern getrunken hatten (EDMONDSON, 2003). Gelegentlich wird auch die Ausscheidung von antimikrobiell wirksamen Substanzen mit der Milch über die Wartezeit hinaus beobachtet (KANG et al., 2005; KRÖMKER, 2007).

## **2.1.2 Einsatz von Antibiotika und Sulfonamiden in der Veterinärmedizin**

Nach wie vor hat der Einsatz antimikrobiell wirksamer Arzneimittel in der Veterinärmedizin einen hohen Stellenwert. Sie gewährleisten eine effiziente Bekämpfung von Infektionskrankheiten und somit auch eine Verhinderung der Ausbreitung von Tierseuchen. Zudem ermöglichen Antiinfektiva die Versorgung des Menschen mit gesunden und qualitativ hochwertigen Lebensmitteln tierischen Ursprungs und verhindern eine Ansteckung mit Zoonosen (UNGEMACH, 1999). Nach einer Studie von BOATMAN (1998) wurden 1996 in der EU etwa 6.750 Tonnen (t) Antibiotika eingesetzt, was 25 % des weltweiten Bedarfs entspricht. Davon wurden 50 % für therapeutische Zwecke verwendet, während die restlichen 50 % als Fütterungsarzneimittel (Wachstumsförderer, Kokzidiostatika) Verwendung fanden. UNGEMACH (1999) schätzt den Anteil, der zu therapeutischen Zwecken bei Nutztieren (einschließlich Pferden) eingesetzt wurde, auf etwa 80 %. Tab. 1 zeigt die mengenmäßigen Anteile der verschiedenen Wirkstoffklassen an den therapeutisch eingesetzten Antiinfektiva. Auf Deutschland entfallen dabei etwa 255 t Wachstumsförderer und 488 t Therapeutika. Allerdings fehlen in Deutschland die rechtlichen Grundlagen für genaue Erhebungen über den Einsatz von Antibiotika, wie dies etwa in skandinavischen Ländern der Fall ist (EMEA, 1999). Es ist bekannt, dass es beim Einsatz der verschiedenen Wirkstoffklassen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Staaten gibt (MÜLLER-BAHRDT, 2004).

Der große Anteil an Tetracyclinen ist dadurch bedingt, dass diese Antibiotika in großen Mengen als Fütterungsarzneimittel verabreicht wurden, wie eine Studie aus der Weser-Ems-Region zeigt (RASSOW und SCHAPER, 1996). Diese Form der Therapie spielt jedoch nur bei Schweinen und Geflügel eine Rolle. Der mengenmäßige Anteil, der an Rinder, einschließlich Kälber, verfüttert wird, fällt kaum ins Gewicht. Nach der Einführung verbindlicher Antibiotika-Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln im Jahre 2000 konnte ein deutlicher Rückgang bei der Verschreibung von Fütterungsarzneimitteln verzeichnet werden. So sank zum Beispiel in Sachsen-Anhalt der Anteil von Chlortetracyclin von 76 % aller eingesetzten Antibiotika auf 14,7 % (UNGEMACH, 2004).

**Tabelle 1:** Verbrauchsmengen verschiedener im Jahre 1997 eingesetzter Antiinfektiva in der Veterinärmedizin in der EU und der Schweiz (BOATMAN, 1998)

<b>Antiinfektivum</b>	<b>Verbrauch (t)</b>	<b>Anteil (%)</b>
β-Lactame	322	9
Tetracycline	2.294	66
Makrolide	424	12
Aminoglykoside	154	4
Fluorchinolone	43	1
Trimethoprim/Sulfonamid	75	2
Sonstige	182	5

In der jüngeren Vergangenheit wurden in Deutschland in der Veterinärmedizin Antiinfektiva für 172 Millionen (2005) bzw. 184 Millionen (2006) Euro verkauft, was 31 % bzw. 32 % des gesamten Tierarzneimittelmarktes entspricht. Im Vergleich zum Gesamtmarkt, an dem der Anteil der Nutztiere etwas mehr als 50 % beträgt, kommt den antimikrobiell wirksamen Stoffen damit ein überdurchschnittlich großes Wachstum zu (BFT, 2005 und 2006). Bei den Milchkühen gelten Mastiserkrankungen als Hauptursache für den Einsatz von Antibiotika, von denen wiederum β-Lactam-Antibiotika am häufigsten eingesetzt werden (ERSKINE et al., 2003; LAUEN, 2006).

### **2.1.3 Gesundheitliche Risiken**

Für jedes Pharmakon gibt es einen, in der Regel in Tierversuchen ermittelten, No-effect-level, aus dem wiederum, zusammen mit einem hypothetischen Körpergewicht des Verbrauchers und einem Sicherheitsfaktor, eine annehmbare Tagesdosis berechnet wird (GROSSKLAUS, 1989). Unter Berücksichtigung der geschätzten Verzehrsgewohnheiten des Verbrauchers ergibt sich daraus rechnerisch der maximal erlaubte Rückstandsgehalt (Maximum Residue Limit, MRL) eines Arzneimittels in Lebensmitteln (siehe 2.1.6). Die potentiellen gesundheitlichen Risiken, die sich für den Verbraucher durch den Verzehr von

arzneimittelhaltiger Milch ergeben können, sind pharmakologisch-toxischer, immunpathologischer oder mikrobiologischer Natur, wovon von den beiden letztgenannten die größere Gefahr ausgeht. So sind laut GRAVERET (1983) primäre toxische Effekte durch den Verzehr Antibiotika-haltiger Milch weder in der Literatur beschrieben noch in Zukunft zu erwarten. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass Arzneimittelkonzentrationen, die zu Nebenwirkungen führen können, in der Milch kaum erreicht werden. Zum anderen ist die Aufnahme vieler Antiinfektiva aus dem Medium Milch reduziert, sei es durch die Bildung schwer löslicher Komplexe, wie es bei den Tetracyclinen der Fall ist (siehe 2.2.4), oder weil die Substanzen, wie zum Beispiel die Aminoglykoside, nach oraler Aufnahme praktisch nicht resorbiert werden (NAU et al., 2003). Andere Medikamente wie die Sulfonamide oder Sulfonamid-Trimethoprim-Kombinationen verlieren zudem in Milch einen Großteil ihrer Wirksamkeit (DEUTZ und OBRITZHAUSER, 2003). Jedoch können sich auch niedrige Antibiotika-Dosen negativ auf die Gesundheit auswirken, indem durch Zurückdrängung der originären Keimflora des Verdauungstraktes die Ansiedlung unerwünschter Mikroorganismen wie Salmonellen oder pathogener *Escherichia (E.) coli* begünstigt wird (CERNIGLIA und KOTARSKI, 1999).

Weitaus größere Bedeutung kommt dem immunpathologischen Aspekt von Arzneimittelrückständen zu. Die meisten gesundheitlichen Schäden bei Verbrauchern, die von Hautirritationen bis hin zum anaphylaktischen Schock reichen können, sind auf allergische Reaktionen gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zurückzuführen (TORRES et al., 2003). GROSSKLAUS (1989) konzentrierte sich in seinen Ausführungen noch auf das allergene Potential von Penicillin, merkte jedoch auch an, dass prinzipiell alle Arzneimittel bei entsprechend sensibilisierten Individuen Allergien auslösen können. Entsprechende Risikoabschätzungen waren in der Folgezeit auch Gegenstand weiterer Publikationen (WOODWARD, 1991; DAYAN, 1993).

Im Hinblick auf die Resistenzsituation wird die potentielle Gefährdung des Menschen durch Lebensmittel, die mit Arzneimittelrückständen belastet sind, kontrovers diskutiert. So sind in der Vergangenheit vor allem Mastbetriebe durch den massenhaften Einsatz von antimikrobiell wirksamen Substanzen zur Prophylaxe oder Leistungsförderung in Verruf geraten, da durch den hohen Selektionsdruck resistente Erreger entstehen, die dann sowohl durch den engen Kontakt zu den Tieren in den Betrieben wie auch über die produzierten Lebensmittel auf den Menschen übergehen können (KRABISCH et al., 1999). Aus humanmedizinischer Sicht wird

dabei besonders auf die Zunahme multiresistenter Enterokokken, insbesondere gegenüber dem Reserveantibiotikum Vancomycin, hingewiesen (NAU et al., 2003). CITAK et al. (2005) untersuchten aus Rohmilch- und Käseproben isolierte *Enterococcus (E.) faecalis*- und *E. faecium*-Stämme und fanden bei diesen Resistenzquoten gegenüber Vancomycin von 67 % bzw. 85,5 %. Zudem wiesen über 90 % der untersuchten Stämme Resistenzen gegenüber Oxacillin und Streptomycin auf. In einer früheren Studie wiesen jedoch KRABISCH et al. (1999) darauf hin, dass Enterokokken eine natürliche chromosomal kodierte Resistenz gegenüber Oxacillin besitzen und auch Aminoglykoside nur unzureichend wirksam sind. Auch fanden sie bei Enterokokken-Isolaten aus bayerischen Milchviehherden lediglich eine Resistenzrate von 2 % bis 3,1 % gegenüber Vancomycin. Bei KRESKEN et al. (2006) variierten die Resistenzquoten gegenüber Vancomycin zwischen 0,8 % bei *E. faecalis* bzw. 13,5 % bei *E. faecium*. Da es keine klare Analyse zu den Risiken einer Resistenzübertragung vom Tier auf den Menschen gibt, schätzte UNGEMACH (2000) das Risiko als eher untergeordnet ein. Laut WITTE (2004) gilt die Entstehung von Resistenzen bei *Salmonella (S.) typhimurium* und *S. enteritidis* gegenüber Fluorchinolonen durch die Antibiotikabehandlung von Tieren als belegt.

#### **2.1.4 Lebensmitteltechnologische Bedeutung**

In vielen Produktionsprozessen sind milchverarbeitende Betriebe auf das Wachstum bestimmter Keime angewiesen. Daher können Arzneimittelrückstände im Ausgangsmaterial zu erheblichen Produktionsfehlern führen, die von Geschmacksfehlern beim Joghurt bis zum Totalverlust ganzer Käsechargen durch mikrobielle Frühblähung reichen können (BAUMGARTNER, 2006). Dabei ist besonders bedenklich, dass eine Störung der eingesetzten Starterkulturen unter Umständen schon durch Arzneimittelkonzentrationen erreicht wird, die sich mit den standardmäßig eingesetzten *Bacillus stearothermophilus* Tests nicht nachweisen lässt (SCHIFFMANN et al., 1992; PACKHAM et al., 2001).

## 2.1.5 Rückstände in Milch

In Deutschland und anderen Industriestaaten wurden in der jüngeren Vergangenheit kaum detailliertere Studien über Tierarzneimittelrückstände in Roh- oder Konsummilch veröffentlicht. Prinzipiell werden in Deutschland routinemäßige Untersuchungen auf Bundes- und Länderebene durchgeführt, wobei die bundesweiten Untersuchungen vom BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL, 2001 und 2006) koordiniert werden. Im Rahmen des jährlich aufgestellten Rückstandskontrollplans werden u. a. Vorgaben zur Untersuchung von Konsummilchproben auf Antibiotika-Rückstände gemacht. Screenings, wie sie in § 2 der Milchgüte-VO gesetzlich vorgeschrieben sind, werden für das Bundesland Bayern vom Milchprüfing Bayern e.V. durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden im Jahr 2005 bei 1.213 (0,21 %) und 2006 bei 1.196 (0,21 %) bayerischen Proben Hemmstoffe nachgewiesen und die entsprechenden Milchlieferanten mit Abzügen belegt (MILCHPRÜFRING BAYERN E.V., 2005 und 2006). Im Rahmen der Untersuchungen wird aber bei hemmstoffpositiven Proben weder eine Identifizierung noch eine Quantifizierung des Hemmstoffes durchgeführt.

Zur Belastungssituation von in Schwellen- oder Entwicklungsländern produzierter Milch wurden in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Untersuchungen publiziert (Tab. 2). Die dabei verwendeten Testsysteme waren hauptsächlich auf den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ausgelegt. Der Anteil der hemmstoffpositiven Proben lag dabei immer um ein Vielfaches höher als bei den in Deutschland durchgeführten Untersuchungen. Neben den bekannten Gründen wie Nichteinhaltung von Wartezeiten oder mangelnde Melkhygiene (2.1.1) wird auch vermutet, dass in manchen Ländern in Ermangelung von Kühlungseinrichtungen der Milch bewusst Antibiotika zur Konservierung zugefügt werden (KURWIJILA et al., 2006).

**Tabelle 2:** Zusammenstellung neuerer Arbeiten zur Belastungssituation von Milch mit Antibiotika- und Sulfonamid-Rückständen

<b>Land</b>	<b>Art (Anzahl) der unter- suchten Proben</b>	<b>Untersuchte Substanzen</b>	<b>Positiv getestete Proben (%)</b>	<b>Identifizierter Hemmstoff (Konzentration in µg/kg)</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>Referenz</b>
Barbados	Bestandsmilch (50)	Hemmstoffe	8,0	β-Lactam-Antibiotika (6,6 – 388,2)	Agardiffusionsverfahren (Delvotest-P <sup>1</sup> )	BAYNES et al. (1999)
Jamaika	Bestandsmilch (30)	Hemmstoffe	10,0	β-Lactam-Antibiotika (k. A.)	Agardiffusionsverfahren (Delvotest-P)	BAYNES et al. (1999)
Deutschland (NRW)	Konsummilch (474); H-Milch (173)	Hemmstoffe	0,21 (Konsummilch)	k. A.	BRT-AS-Test	SCHÜTTEL et al. (2000)
Deutschland (NRW)	Konsummilch (80); H-Milch (39)	Chloramphenicol, Tetracyclin, Sulfonamide, Streptomycin	15 (Konsummilch); 38,5 (H-Milch)	Sulfonamide (11,3 – 59,3 bei Konsummilch; 25,8 – 50,8 bei H-Milch)	k. A.	SCHÜTTEL et al. (2000)

Fortsetzung Tab. 2

<b>Land</b>	<b>Art (Anzahl) der unter- suchten Proben</b>	<b>Untersuchte Substanzen</b>	<b>Positiv getestete Proben (%)</b>	<b>Identifizierter Hemmstoff (Konzen- tration in µg/kg)</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>Referenz</b>
Kenia	Tankmilch (1.109)	Hemmstoffe	14,9	Penicillin G (bei 118 Proben > 4)	Agardiffusions- verfahren (Röhrchentest)	SHITANDI und STERNESJÖ (2001)
Deutschland	Tank- und Bestandsmilch (1.231)	Hemmstoffe	0,16	Penicilline (k.A.)	k. A.	BVL (2001)
Venezuela	Konsummilch (104)	Penicillin G	0,96	Penicillin G (0,95)	HPLC	ALLARA et al. (2002)
Deutschland (S-H)	Tankmilch (19.518)	Hemmstoffe	0,53 (BR-AS- Test); 0,45 (Delvotest SP)	β-Lactam-Antibiotika (bei 102 von 104 im BR-AS-Test positiven Proben)	BR-AS spezial bzw. Delvo SP	SUHREN (2002)
Deutschland (S-H)	Tankmilch (7.544)	Chinolone	0,01	Ciprofloxacin (10)	mikrobiolog. <i>E.coli</i> Test	SUHREN (2002)

Fortsetzung Tab. 2

<b>Land</b>	<b>Art (Anzahl der untersuchten Proben)</b>	<b>Untersuchte Substanzen</b>	<b>Positiv getestete Proben (%)</b>	<b>Identifizierter Hemmstoff (Konzentration in µg/kg)</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>Referenz</b>
Mali	Bestandsmilch (292)	Hemmstoffe	9,98	k. A.	Joghurt-Test, Agardiffusionsverfahren (Delvotest)	BONFOH et al. (2003)
Kenia	Bestandsmilch (1.600)	Hemmstoffe	12,9	β-Lactam-Antibiotika (>4)	Agardiffusionsverfahren (Röhrchentest)	SHITANDI und STERNESJÖ (2004)
Türkei	Konsummilch und H-Milch (293)	Streptomycin (126) und Tetracyclin (167)	77,8 (Streptomycin); 96,4 (Tetracyclin)	eine positive Probe lag über dem MRL-Wert von Streptomycin (263)	EIA	AKSU et al. (2004)
Kenia	Rohmilch (854); Konsummilch (110)	Hemmstoffe	7,6 (Rohmilch); 8,2 (Konsummilch)	k. A.	Charm-AIM-96 <sup>2</sup>	KANG'ETHE et al. (2005)
Elfenbeinküste	drei verschiedene Milchsorten (120)	Penicillin G	5,83	Penicillin G (>4)	HPLC	AKE et al. (2006)

Fortsetzung Tab. 2

<b>Land</b>	<b>Art (Anzahl) der unter- suchten Proben</b>	<b>Untersuchte Substanzen</b>	<b>Positiv getestete Proben (%)</b>	<b>Identifizierter Hemmstoff (Konzen- tration in µg/kg)</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>Referenz</b>
Tansania	Bestandsmilch (986)	Hemmstoffe	36,0	k. A.	Charm-AIM-96	KURWIJILA et al. (2006)
Deutschland	Tank- und Bestandsmilch (1.960)	Hemmstoffe	0,1	Ampicillin (24 - 26)	k. A.	BVL (2006)

<sup>1</sup>Quantifizierung durch HPLC

<sup>2</sup>Nachuntersuchung positiver Proben mit Charm-SL β-Lactam bzw. Tetracyclin

*Abkürzungsverzeichnis zu Tab. 2:*

HPLC - Hochdruckflüssigkeitschromatographie

k. A. - keine Angaben

NRW - Nordrhein-Westfalen

S-H - Schleswig-Holstein

## 2.1.6 Rechtliche Grundlagen

Am 01.01.2006 ist eine Neufassung des gemeinschaftlichen europäischen Hygienerechts, auch EU-Lebensmittelhygienepaket genannt, in Kraft getreten, das unter anderem auch grundsätzliche Anweisungen für den Umgang mit Tierarzneimitteln in der Milchproduktion enthält. Während sich die **VO (EG) Nr. 854/2004** und **Nr. 882/2004** ausschließlich mit Anweisungen an die amtliche Überwachung befassen, repräsentiert die **VO (EG) Nr. 852/2004** die generelle Basisregelung für alle Betriebe in sämtlichen Bereichen der Lebensmittelkette (ALBRECHT und BAUMGARTNER, 2006). Zusätzlich ergibt sich aus der VO (EG) 852/2004 eine Buchführungspflicht für die Milcherzeuger über das Krankheitsgeschehen und die eingesetzten Arzneimittel im Bestand (MÜLLER, 2006). Nach der **VO (EG) Nr. 853/2004**, Anhang III Abschnitt 9 darf Rohmilch von Kühen, denen nicht zugelassene Stoffe verabreicht wurden oder bei denen die Wartezeit nach Verabreichung einer zugelassenen Arznei nicht eingehalten wurde, nicht in den Verkehr gebracht werden. Das gleiche gilt, wenn die Milch pharmakologische Rückstände aufweist, die über dem zugelassenen MRL nach VO (EWG) 2377/90 liegen. Zudem beinhaltet die VO (EG) 853/2004 diverse Hygienevorschriften, in denen u. a. die Kenntlichmachung von Tieren nach tierärztlicher Behandlung mit Stoffen, die Rückstände verursachen können, vorgeschrieben wird. Auf nationaler Ebene löst das neue Regelwerk die Milch-VO ab.

Bereits zwei Jahre zuvor wurde die **VO (EG) Nr. 178/2002** erlassen, die u. a. auch den Milcherzeugern die Etablierung eines Rückverfolgbarkeitssystems auferlegt und damit eng mit den Vorschriften der VO (EG) 852/2004 verzahnt ist. Die Umsetzung ist für die Betriebe durch die Teilnahme am etablierten bundeseinheitlichen Qualitätsmanagement (QM)-System-Milch zu erreichen, das von verschiedenen Verbänden in Gemeinschaft auf der Basis milchrechtlicher Vorgaben erarbeitet wurde (MÜLLER, 2006). In Bayern erfolgt die Kontrolle des Systems durch den Milchprüfing Bayern. Dieser ist auch an der Umsetzung der **Milchgüte-VO** beteiligt, nach der beim Erzeuger monatlich zwei Untersuchungen gem. § 64 LFGB stattzufinden haben. Bei positiven Rückstandsbefunden erfolgt ein Abzug vom Auszahlungspreis in Höhe von fünf ct/kg Milch für die Dauer eines Monats. Allerdings ist keine Differenzierung der Hemmstoffe vorgeschrieben, so dass die Kontrollen nach der Milchgüte-VO keinen Ersatz für Untersuchungen aus lebensmittelrechtlicher Sicht darstellen.

Neben dem Verweis auf die amtlichen Untersuchungsmethoden beinhaltet das oben angesprochene **Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)** ein Verkehrsverbot für Lebensmittel, die von Tieren stammen, denen nicht zugelassene Arzneimittel verabreicht wurden bzw. wenn die Rückstände zugelassener Stoffe den MRL-Wert überschreiten. Falls den Tieren zugelassene Pharmaka verabreicht wurden, dürfen Lebensmittel nur nach Einhaltung der festgesetzten Wartezeit gewonnen werden. Diese Regelungen entsprechen im Wesentlichen denen, die später für Rohmilch in der VO (EG) 853/2004 festgelegt wurden.

In § 10 Abs. 1 LFGB und der VO (EG) 853/2004 wird auf die **VO (EWG) Nr. 2377/90** verwiesen. Diese legt in den Anhängen I bis IV EU-weit den MRL von Arzneimitteln in Lebensmitteln fest. Daraus ergibt sich, dass neue Pharmaka erst eine Zulassung für lebensmittelliefernde Tiere erhalten, wenn zuvor entsprechende MRL-Werte festgelegt wurden (WOODWARD, 1993). In Tab. 3 sind die derzeit gültigen MRL-Werte für einige Antiinfektiva aufgeführt. Infolge der Praktiken einer Molkerei in Großbritannien, die hemmstoffpositive Milch mit unbelasteter Milch verschnitt und weiterverarbeitete, stellte die Europäische Union in der **Entscheidung 2006/694/EG** noch einmal klar, dass positiv auf Hemmstoffe getestete Milch, bei der kein Nachweis erbracht wurde, dass die enthaltenen Rückstandskonzentrationen den MRL-Wert nicht überschreiten, nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt ist und beseitigt werden muss.

Die rechtlichen Grundlagen für ein europäisches Netzwerk der Rückstandskontrollen und den darin eingegliederten Nationalen Rückstandskontrollplänen wurden durch die **Richtlinie 96/23/EWG** und die **Entscheidung 97/747/EWG** gelegt. Danach hat jeder EU-Staat nach einem jährlich aufzustellenden Plan, Rückstandsuntersuchungen bei tierischen Lebensmitteln durchzuführen. Die Kriterien für die dabei verwendeten Screening- und Bestätigungsmethoden wurden in der **Entscheidung 2002/657/EG** spezifiziert (GOWIK, 2006; SCHMÄDICKE, 2006). Unabhängig von diesen Regelungen führen viele europäische Länder analog zu den Bestimmungen der Milchgüte-VO auch regelmäßige Hemmstoffuntersuchungen von Tank- bzw. Anlieferungsmilch durch. Dabei weichen die Praktiken der einzelnen Staaten bezüglich der Untersuchungsfrequenz, der Untersuchungsmethoden wie auch der Ergebnisinterpretation zum Teil erheblich voneinander ab (SUHREN, 2002).

**Table 3:** *Rückstandshöchstmengen (MRL) einiger ausgewählter pharmakologisch wirksamer Stoffe, die für Milchkühe zugelassen sind (gem. Anhang I der VO (EWG) 2377/90). Die Angabe des MRL bezieht sich auf den jeweiligen Rückstand in Milch*

<b>Pharmakologisch wirksamer Stoff</b>	<b>Marker-Rückstand</b>	<b>MRL (µg/kg)</b>
Ampicillin	Ampicillin	4
Amoxicillin	Amoxicillin	4
Benzylpenicillin	Benzylpenicillin	4
Cloxacillin	Cloxacillin	30
Dicloxacillin	Dicloxacillin	30
Oxacillin	Oxacillin	30
Danofloxacin	Danofloxacin	30
Enrofloxacin	Enrofloxacin + Ciprofloxacin	100
Flumequin	Flumequin	50
Marbofloxacin	Marbofloxacin	75
Gentamicin	Summe aus Gentamicin C1, Gentamicin C1a, Gentamicin 2 und Gentamicin C 2a	100
Neomycin	Neomycin B	1.500
Streptomycin	Streptomycin	200
Dihydrostreptomycin	Dihydrostreptomycin	200
Chlortetracyclin		100
Oxytetracyclin	Summe der Muttersubstanzen und ihren 4-Epimeren	100
Tetracyclin		100
Sulfonamide	Summe der Einzelsubstanzen	100

Für Tierärzte ist bei der Behandlung lebensmittelliefernder Tiere die **Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV)** relevant, nach der die Abgabe von Medikamenten an den Tierhalter nur im Rahmen einer ordnungsgemäßen Behandlung, die eine angemessene Untersuchung mit abschließender Erfolgskontrolle beinhaltet, zulässig ist. Zusätzlich wird durch das **Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG)** die Abgabe von Arzneimitteln an den Tierhalter geregelt. Des Weiteren gibt es seit Dezember 2006 von der Bundestierärztekammer aufgestellte verbindliche Leitlinien für Tierärzte für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Substanzen (siehe 2.1.2). Diese verlangen von den Tierärzten beim Einsatz von Antibiotika eine präzise (mikrobiologische) Diagnose und auf Basis der Zulassungsbedingungen die Auswahl des am besten geeigneten Wirkstoffes. Zusätzlich dazu wird ein restriktiver Einsatz von Reserveantibiotika gefordert (UNGEMACH, 2004).

## **2.2 Charakteristika wichtiger Antiinfektiva**

### **2.2.1 Allgemeines**

Bei der folgenden Charakterisierung der Antibiotika und Sulfonamide wird im Wesentlichen nur auf für diese Arbeit relevante Eigenschaften der Substanzen eingegangen. Für detailliertere Informationen speziell zu den Bereichen Pharmakodynamik und Resistenzentwicklung sei auf gängige pharmakologische Lehrbücher verwiesen (MUTSCHLER et al., 2001; AKTORIES et al., 2005; BURGIS, 2005; SCHMIDT, 2007).

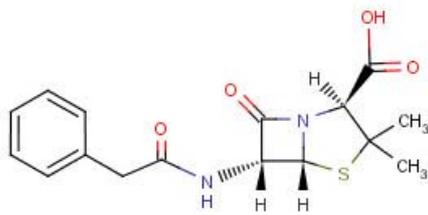
## **2.2.2 Penicilline**

### **2.2.2.1 Allgemeines**

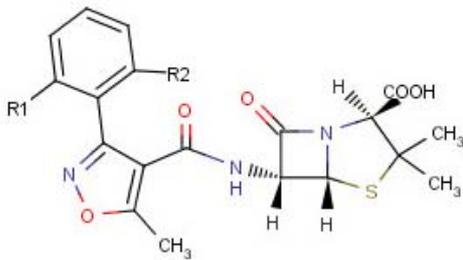
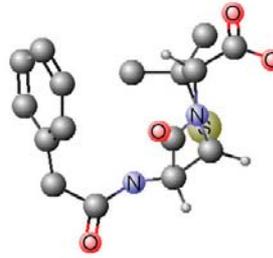
Antibiotika aus der Gruppe der  $\beta$ -Lactame sind die in der Nutztierpraxis am häufigsten eingesetzten Antiinfektiva. Bei einer Erhebung unter bayerischen Tierärzten gaben 90 % der Rinderpraktiker an,  $\beta$ -Lactame häufig einzusetzen (LAUEN, 2006). Strukturell gesehen kann man diese Gruppe in Penicilline, Cephalosporine, Cephamycine und Oxacepheme einteilen, wobei die beiden letztgenannten in der Veterinärmedizin keine Rolle spielen (LÖSCHER et al., 2006). Sämtliche  $\beta$ -Lactame gehen zurück auf das von Alexander Fleming entdeckte Penicillin. Dieser beobachtete bei einer zufällig durch den Schimmelpilz *Penicillium notatum* verunreinigten Bakterienkultur um den Schimmelpilz herum bakterienfreie Zonen und konnte in weitergehenden Untersuchungen bestätigen, dass der Pilz eine Substanz mit antibakterieller Wirkung synthetisiert (FLEMING, 1929). Im Jahr 1940 gelang es einer Oxford-Gruppe um Howard Florey und Ernst Chain, erstmals Penicillin G zu isolieren und damit erfolgreich Tierversuche durchzuführen. Nach dem Nachweis der fehlenden Toxizität für den menschlichen Organismus wurde Penicillin während des zweiten Weltkrieges in den USA erstmals großtechnisch gewonnen, um damit zunächst Soldaten und nach Beendigung des Krieges auch die zivile Bevölkerung zu behandeln. Fleming, Chain und Florey erhielten für ihre Forschungen 1945 gemeinsam den Nobelpreis für Medizin (GODDEMEIER, 2006).

### **2.2.2.2 Struktur und Synthese**

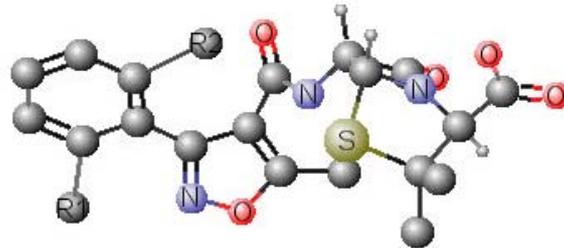
Die Gruppe der Penicilline kann in natürliche und semisynthetische Penicilline eingeteilt werden (OTTEN et al., 1975). Die natürlichen Penicilline G und V - letzteres ist in der Tiermedizin nicht zugelassen - werden biofermentativ durch Kulturen von *Penicillium notatum* bzw. *Penicillium chrysogenum* produziert. Das Grundgerüst sämtlicher Penicilline stellt die 6-Aminopenicillansäure (6-APA, Abb. 1) dar. Durch Acylierung dieses Grundgerüsts erfolgt die Synthese der semisynthetischen Penicilline, zu denen auch die Isoxazolyl-Penicilline gehören. Diese sind durch ihre längere, polare Seitenkette im Gegensatz zu den übrigen Penicillinen nicht durch Penicillinasen angreifbar (GLOMBITZA, 1964; AKTORIES et al., 2005)



Penicillin-G



Isoxazolyl-Penicilline



$R_1 = R_2 = H$  : Oxacillin

$R_1 = Cl$ ;  $R_2 = H$  : Cloxacillin

$R_1 = R_2 = Cl$  : Dicloxacillin

**Abbildung 1:** Strukturformeln einiger wichtiger Verbindungen aus der Gruppe der Penicilline

### 2.2.2.3 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Die Penicilline können aufgrund ihrer pharmakodynamischen und –kinetischen Eigenschaften in vier Gruppen unterschieden werden (MUTSCHLER et al., 2001; LÖSCHER et al., 2006; SCHMIDT, 2007):

- 1) Penicillin G-Salze: Zu dieser Gruppe gehören auch die Depotpenicilline, die durch Salzbildung mit Procain oder Benzathin gewonnen werden.

2) Oralpenicilline: Diese Gruppe beinhaltet säurestabile Penicilline, die in der Veterinärmedizin nur zur Weiterbehandlung nach einer parenteralen Initialdosis Verwendung finden (z. B. Phenoxymethylpenicillin, Propicillin).

3) Penicilline mit erweitertem Wirkungsspektrum:

Dazu zählen die Amino- und die Acylaminopenicilline. Bei den Aminopenicillinen handelt es sich um säurestabile Breitspektrum-penicilline, deren wichtigste Vertreter Ampicillin und Amoxicillin darstellen. Die Acylaminopenicilline werden als Reserveantibiotika für die Humanmedizin zurückgehalten.

4) Penicillinase-stabile Penicilline:

Diese Gruppe wird von den Isoxazolyl-Penicillinen gebildet, die aufgrund ihrer Hauptindikation auch „Staphylokokken-Penicilline“ genannt werden. Ihre wichtigsten Vertreter sind Cloxacillin, Dicloxacillin und Oxacillin.

Die Art der Verabreichung variiert zwischen den einzelnen Gruppen, wobei aufgrund der großen Sensibilisierungsgefahr gegen Penicillin auf eine topische Anwendung verzichtet werden sollte (MUTSCHLER et al., 2001). Penicillin G ist nicht säurestabil und muss daher parenteral appliziert werden. Die Isoxazolyl-Penicilline werden nach oraler Gabe zwar rasch, aber nicht vollständig resorbiert, wogegen bei Amoxicillin eine Resorptionsquote von 80 % erreicht werden kann. Da die Penicilline als schwache Säuren im Blut in überwiegend ionisierter Form vorliegen, wird die Blut-Euter-Schranke praktisch nicht überwunden (DEUTZ und OBRITZHAUSER, 2003). Wie alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika werden auch Penicilline überwiegend renal ausgeschieden. Dabei liegt die Halbwertszeit von Penicillin G beim Rind bei etwa 40 Minuten. Die Ausscheidung geschieht zum Großteil in unverändertem Zustand. Zu einem geringen Teil findet jedoch auch eine Metabolisierung statt, hauptsächlich durch hydrolytische Spaltung zu inaktiven Metaboliten (Penicillonsäuren, Penicilloatderivate). Daneben können Isoxazolyl-Penicilline durch Hydroxylierung der Methylgruppe des Isoxazolrings zu mikrobiologisch aktiven Hydroxymethylderivaten metabolisiert werden (AKTORIES et al., 2005; LÖSCHER et al., 2006).

#### 2.2.2.4 Therapeutische Anwendung beim Rind

Penicillin G wird als Benzylpenicillin-Natrium zur parenteralen und als Procainsalz auch zur intramammären Therapie von durch grampositive Erreger hervorgerufenen Mastitiden eingesetzt. Bei der Kombination von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit Aminoglykosiden kommt es aufgrund der Zellwandschädigung durch die  $\beta$ -Lactame zu einer erleichterten Aufnahme der Aminoglykoside in die Bakterienzelle. Dieser synergistische Effekt wird bei Kombinationspräparaten bestehend aus einem Benzylpenicillin-Salz und Neomycin- bzw. Streptomycin-Sulfat zur Behandlung von Mastitiden oder zum Trockenstellen von Kühen genutzt (MUTSCHLER et al., 2001; LÖSCHER et al., 2006; EUROVET, 2007).

Aminopenicilline werden in der Veterinärmedizin bevorzugt zur Behandlung von Erkrankungen des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (Uterusstäbe) eingesetzt. Sie zeichnen sich dabei durch eine außerordentlich gute Verträglichkeit und eine bis zu zehnmal stärkere Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Erregern als Penicillin G aus. Allerdings ist hier auch eine verschlechterte Resistenzsituation in den letzten Jahren zu beobachten (siehe 2.2.2.5). Auf eine orale Verabreichung sollte beim Rind jedoch aufgrund der Gefahr auftretender Magen-Darm-Störungen von vorneherein verzichtet werden. Für die intramammäre Behandlung von Mastitiden sind Kombinationspräparate aus Ampicillin und Cloxacillin auf dem Markt (LÖSCHER et al., 2006; EUROVET, 2007).

Von den Isoxazolyl-Penicillinen spielen in der Veterinärmedizin nur noch Cloxacillin und Oxacillin eine Rolle, wobei die intramammäre Anwendung den größten Stellenwert besitzt (LÖSCHER et al., 2006). So sind Präparate zur Therapie bzw. Prophylaxe von Mastitiden während der Trockenstellperiode, wie auch solche zur Therapie akuter Erkrankungen in der Laktation auf dem Markt. Dabei steht die Bekämpfung von Streptokokken und  $\beta$ -Lactamase-bildenden Staphylokokken im Vordergrund (EUROVET, 2007). Es ist jedoch zu beachten, dass besonders bei durch *S. aureus* verursachten Mastitiden die intrazisternale Verabreichung von Antibiotika lediglich als zusätzliche therapeutische Maßnahme neben der parenteralen Verabreichung gesehen werden sollte. Bessere bakteriologische Heilungsraten können durch eine kombinierte systemisch-intramammäre Therapie erzielt werden (OWENS et al., 1988).

### **2.2.2.5 Resistenzlage**

Einem Monitoring in Deutschland zufolge ist lediglich bei älteren  $\beta$ -Lactamen wie Penicillin G oder Ampicillin mit einer Resistenzquote von über 20 % gegenüber wichtigen Mastitis-Erregern zu rechnen (WALLMANN, 2004). Eine Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft zeigte, dass 50,7 % der *E. coli*-Stämme resistent gegenüber Ampicillin sind. Für *S. aureus* und Penicillin G wurden sogar Prozentsätze von 76,2 % ermittelt (KRESKEN et al., 2006). HEISIG (2006) schätzt den Anteil aller klinischen *S. aureus*-Stämme, die resistent gegenüber sämtlichen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind, auf durchschnittlich über 20 % ein.

## **2.2.3 Aminoglykosidantibiotika**

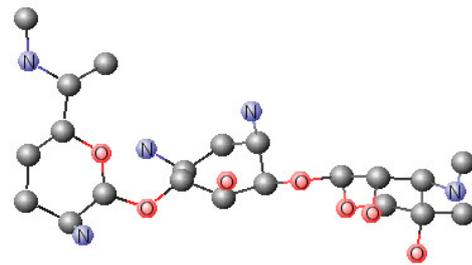
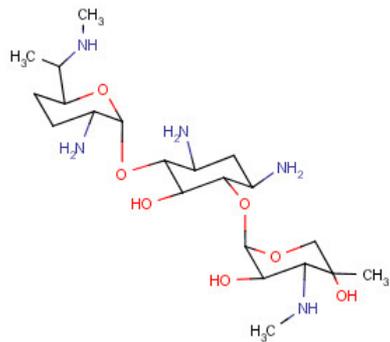
### **2.2.3.1 Allgemeines**

Die Aminoglykoside können nach Art und Verknüpfung ihrer Zucker in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Es handelt sich dabei um die Streptomycin-, Neomycin-, Kanamycin- und Gentamicin-Gruppe, sowie um das strukturell verwandte Spectinomycin (MUTSCHLER et al., 2001; BURGIS, 2005). Während das älteste Aminoglykosid, Streptomycin, in der Humanmedizin nur noch gegen Tuberkulose eingesetzt wird und die Resistenzlage auch in der Tiermedizin ungünstig ist, sind die übrigen Vertreter aufgrund eines breiten Wirkungsspektrums und einer synergistischen Wirkungssteigerung in Kombination mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (siehe 2.2.2.4) noch von Bedeutung (AKTORIES et al., 2005). Für die vorliegende Arbeit spielen nur die Vertreter Streptomycin, Neomycin und Gentamicin, die in Abb. 2 dargestellt sind, eine Rolle.

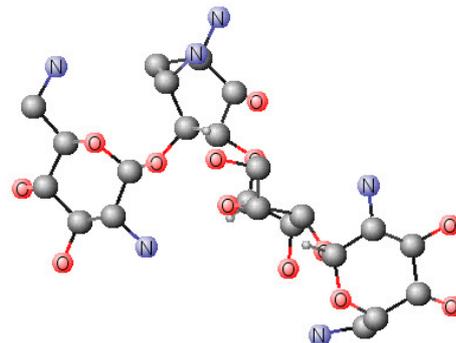
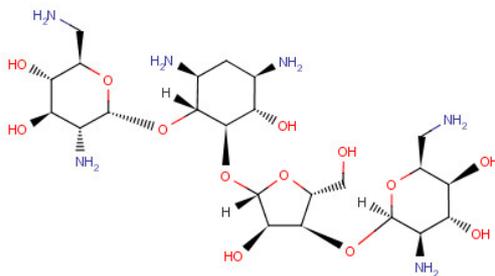
### **2.2.3.2 Struktur und Synthese**

Die Herstellung der Aminoglykoside erfolgt auf biosynthetischem oder semisynthetischem Weg aus *Micromonospora*- (Gentamicin-Gruppe) oder *Streptomyces*-Arten (übrige Aminoglykoside). Es handelt sich dabei um Oligosaccharide aus einem zentralen Aminozucker, ein Aminocyclitol, an das glykosidisch zwei oder drei Zucker bzw.

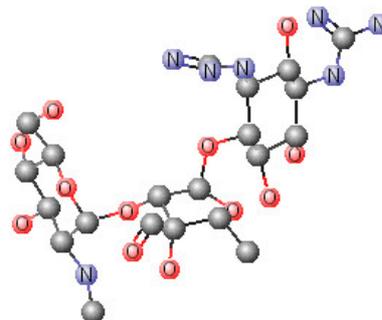
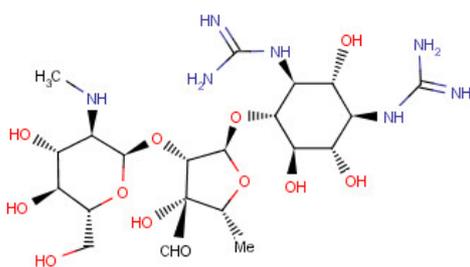
Aminozucker gebunden sein können. Die vorhandenen OH-Gruppen geben den Aminoglykosiden hydrophile Eigenschaften, bieten aber auch Angriffspunkte für inaktivierende Enzyme und behindern eine Resorption nach oraler Verabreichung. Freie NH<sub>2</sub>-Gruppen machen sie leicht basisch und nucleophil, was für die antibakterielle Aktivität entscheidend ist, die Wirksamkeit der Aminoglykoside in saurem Milieu aber reduziert (AKTORIES et al., 2005; BURGIS, 2005).



Gentamicin



Neomycin



Streptomycin

**Abbildung 2:** Strukturformeln einiger Aminoglykosidantibiotika

### **2.2.3.3 Pharmakokinetik**

Aminoglykosidantibiotika zeichnen sich durch einen raschen Wirkungseintritt aus, dafür werden aber intakte biologische Barrieren kaum passiert. Aufgrund der in 2.2.3.2 erwähnten Eigenschaften werden nach oraler Verabreichung keine therapeutischen Blutspiegel erreicht. Die Ausscheidung erfolgt in aktiver Form nach einer Halbwertszeit von etwa zwei Stunden ausschließlich renal durch glomeruläre Filtration. Aufgrund eines hohen oto- und nephrotoxischen Potentials der Aminoglykoside, insbesondere von Neomycin, wird eine Anwendung nur nach sorgfältiger Abwägung empfohlen. Neben diesen möglichen Nebenwirkungen wurden bei älteren Kühen auch allergische Reaktionen nach der Gabe von Streptomycin beobachtet (AKTORIES et al., 2005; LÖSCHER et al., 2006; SCHMIDT, 2007).

### **2.2.3.4 Therapeutische Anwendung beim Rind**

Wie bereits unter Punkt 2.2.2.4 beschrieben, werden Streptomycin und Neomycin in Kombination mit Penicillin G zur Therapie und Prophylaxe von Mastitiden eingesetzt. ZIV (1980) stellte jedoch fest, dass Kombinationspräparate mit Neomycin bei der Behandlung von Staphylokokken- oder Streptokokken-Mastitiden keine erkennbaren Vorteile gegenüber einer alleinigen Behandlung mit Penicillin G bringen. Obwohl die Verteilung von Aminoglykosiden im Euter sowohl nach parenteraler als auch nach intramammärer Verabreichung als schlecht beurteilt wird, sind für Neomycin auch Monopräparate zur Mastitisbehandlung auf dem Markt (DEUTZ und OBRITZHAUSER, 2003; EUROVET, 2007). Bis vor kurzem waren auch Euterinjektoren, die Gentamicinsulfat als Wirkstoff enthielten, erhältlich, die jedoch nach 2006 vom Markt genommen wurden. Heute werden noch Gentamicin-haltige Präparate zur parenteralen Behandlung von Infektionen der Atmungs- und Verdauungsorgane, sowie des Urogenitaltraktes angeboten (EUROVET, 2007).

### **2.2.3.5 Resistenzlage**

Wie bereits bei 2.2.3.1 erwähnt, ist die Resistenzlage bei Streptomycin sehr ungünstig. So sind 30 - 70 % der *E. coli*-Stämme und bis zu 45 % der Salmonellen resistent. Gegenüber Kombinationspräparaten mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika treten häufig Mehrfachresistenzen auf, weshalb solche Arzneimittel nur noch bedingt empfohlen werden (LÖSCHER et al., 2006; SCHMIDT, 2007).

Während auch gegenüber Neomycin bereits häufig Resistenzen zu verzeichnen sind, ist die Resistenzlage bei Gentamicin noch als günstig zu beurteilen. So sind laut KRESKEN et al. (2006) 8,2 % der *E. coli*- und 7,6 % der *S. aureus*-Stämme als resistent zu beurteilen. Dabei liegt eine sogenannte einseitige Resistenz vor, das heißt, dass gegenüber Gentamicin resistente Erreger auch gegenüber Streptomycin und Neomycin resistent sind, aber nicht umgekehrt (LÖSCHER et al., 2006).

## **2.2.4 Tetracycline**

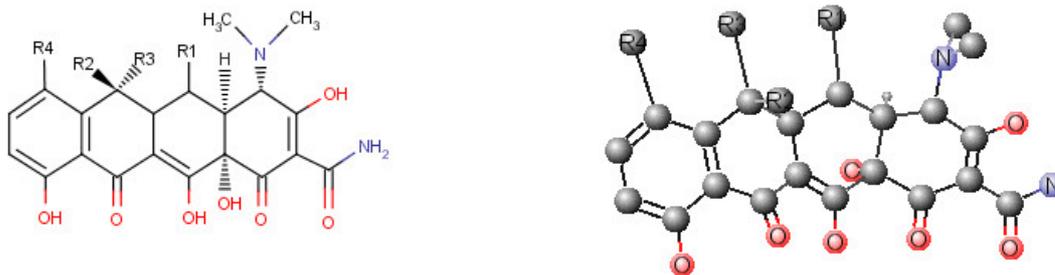
### **2.2.4.1 Allgemeines**

Als erster Vertreter der Tetracycline konnte im Jahre 1948 Chlortetracyclin isoliert werden, bevor es Anfang der 50er Jahre in die Therapie eingeführt wurde (PALLETT, 1988; AKTORIES et al., 2005).

Grundsätzlich zeichnen sich Tetracycline durch ein breites Wirkungsspektrum aus, eine Tetracyclin-Sensitivität ist bei den wichtigsten Mastitiserregern wie Staphylokokken, Streptokokken, *E. coli* oder Klebsiellen zu finden. Aufgrund zunehmender Resistenzen und der Tatsache, dass es innerhalb der Tetracycline fast immer Kreuzresistenzen gibt, sind sie heute lediglich noch bei Infektionen mit intrazellulär gelegenen Erregern, wie Chlamydien, Mykoplasmen und Rickettsien, oder *Campylobacter* indiziert (LÖSCHER et al., 2006).

## 2.2.4.2 Struktur und Synthese

Allen Tetracyclinen gemein ist ein Grundgerüst aus vier Sechseringen, wobei sich die einzelnen Vertreter durch Substituenten in den Positionen 2, 5, 6 und 7 unterscheiden (LÖSCHER et al., 2006; SCHMIDT, 2007). Die natürlichen Tetracycline, zu denen Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Demethylchlortetracyclin gehören, werden aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten gewonnen. Heute besitzen in der Humanmedizin allerdings nur noch die teilsynthetisch gewonnenen Derivate Doxycyclin und Minocyclin klinische Bedeutung (MUTSCHLER et al., 2001). Von diesen beiden Wirkstoffen ist nur Doxycyclin in der Tiermedizin zugelassen, allerdings nicht bei Tieren, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird. Die Struktur der Tetracycline mit veterinärmedizinischer Zulassung sind in Abb. 3 dargestellt.



	R1	R2	R3	R4
Tetracyclin	H	OH	CH <sub>3</sub>	H
Chlortetracyclin	H	OH	CH <sub>3</sub>	Cl
Oxytetracyclin	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H
Doxycyclin	OH	H	CH <sub>3</sub>	H

**Abbildung 3:** Grundaufbau veterinärmedizinisch interessanter Tetracycline

#### **2.2.4.3 Pharmakokinetik**

Mit der Verabreichung von Tetracyclinen wird ein hohes Verteilungsvolumen und damit auch eine hohe zelluläre Gewebkonzentration erreicht, was aber wiederum auch eine höhere Inzidenz von Nebenwirkungen mit sich bringt (LÖSCHER et al., 2006). Die Blut-Milch-Schranke wird von allen Vertretern gut überwunden, so dass in der Milch ca. 50 % der Serumkonzentration erreicht wird. Allerdings bilden Tetracycline mit Calcium schwer lösliche Chelate, was die Resorptionsrate aus der Milch heraus stark reduziert (AKTORIES et al., 2005; BURGIS, 2005). Während Chlortetracyclin weitgehend zum inaktiven Isochlortetracyclin umgewandelt wird, ist die Metabolisierungsrate bei den übrigen Vertretern gering und die Metaboliten sind nur teilweise bekannt. So kann in der Leber eine rasche Glucuronidierung mit anschließender Ausscheidung über die Galle stattfinden. Hauptsächlich findet allerdings eine renale Elimination in aktiver Form durch glomeruläre Filtration statt (AKTORIES et al., 2005; LÖSCHER et al., 2006; SCHMIDT, 2007).

#### **2.2.4.4 Therapeutische Anwendung beim Rind**

In der Praxis kommt den Tetracyclinen große Bedeutung als Fütterungsarzneimittel zu. Während Tetracyclin zu 50 % resorbiert wird, sollte Chlortetracyclin beim erwachsenen Rind nicht oral angewendet werden. Trotz eigentlich ungünstiger Resistenzlage wird es noch als Blauspray für die lokale Wundbehandlung verwendet. Auch für die intrauterine Anwendung bei postpuerperalen Komplikationen sind von allen zugelassenen Tetracyclinen Präparate auf dem Markt. Bei dieser Form der Verabreichung wird jedoch kein therapeutischer Blutspiegel erreicht (LÖSCHER et al., 2006; EUROVET, 2007).

#### **2.2.4.5 Resistenzlage**

Resistenzen gegenüber Tetracyclinen sind weit verbreitet. So wurden in einer Studie des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bei 17 getesteten Antibiotika für Tetracyclin und einige ältere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika die höchsten Resistenzprozentätze festgestellt (WALLMANN, 2004). PIRRO et al. (1999) stuften 77,1 % der untersuchten *Salmonella*- und *E. coli*-Stämme als Tetracyclin-resistent ein.

### **2.2.5 Chinolone**

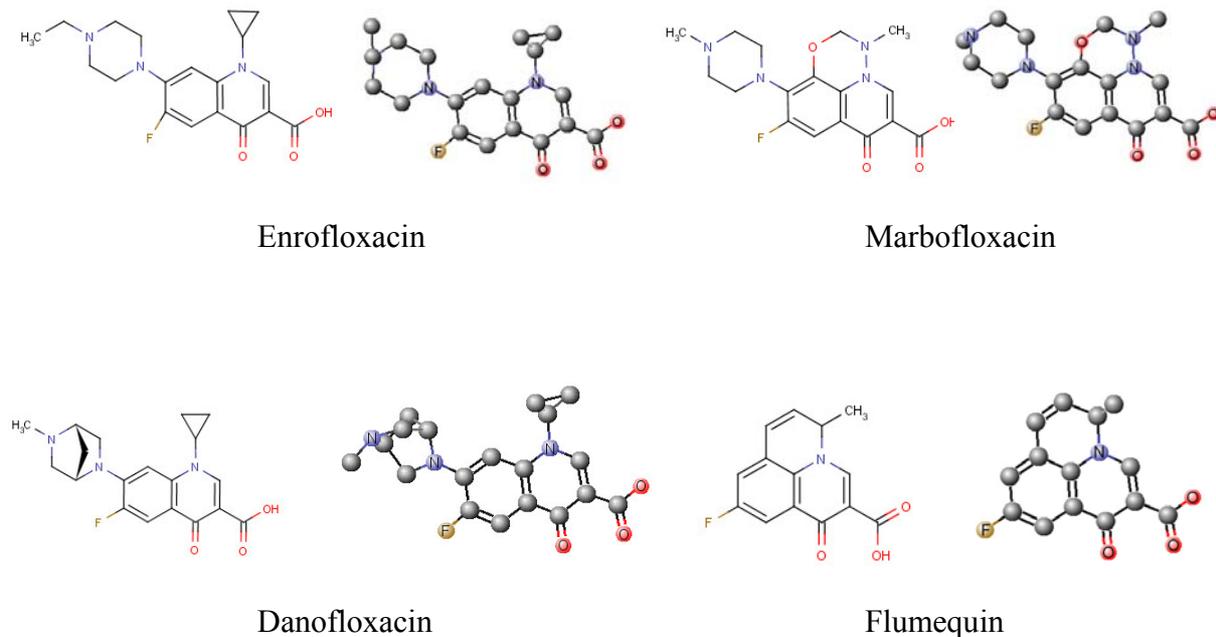
#### **2.2.5.1 Allgemeines**

Prototyp der Chinolone ist die 1962 patentierte Nalidixinsäure. Zusammen mit der Gruppe der Naphtyridine, Cinnoline und den Pyridopyrimidinen werden sie zu den Gyrasehemmern der ersten Generation gezählt (LÖSCHER et al., 2006). Eine wichtige Weiterentwicklung der Chinolone stellte die Einführung eines Fluoratoms in Position sechs des Grundgerüsts dar, wodurch eine erhebliche Aktivitätssteigerung erreicht wurde. Als erster Vertreter dieser Gruppe der Fluorchinolone, die auch als Gyrasehemmer der zweiten Generation bezeichnet werden, wurde 1984 Norfloxacin auf den Markt gebracht. Während die Gyrasehemmer der ersten Generation durch ein schmales Wirkungsspektrum, geringe Wirksamkeit, ungünstige Pharmakokinetik und erhebliche Resistenzentwicklung gekennzeichnet sind, zählen die Fluorchinolone zu den bedeutendsten Entwicklungen antibakteriell wirksamer Substanzen der letzten Jahrzehnte (STEIN, 1988; APPELBAUM und HUNTER, 2000; MUTSCHLER et al. 2001).

#### **2.2.5.2 Struktur und Synthese**

Die Fluorchinolone werden alle synthetisch hergestellt. Dabei diente die Nalidixinsäure als Ausgangssubstanz für die Entwicklung. Durch die Einführung eines Piperazins in der C<sub>7</sub>-Position entstand die Pipemidsäure, aus der durch Fluorierung an Position sechs des Grundgerüsts die Fluorchinolone gewonnen wurden. Während diese Entwicklung nahezu 20

Jahre dauerte, kamen nach der Einführung von Norfloxacin rasch weitere Vertreter hinzu. So wurde 1980 mit Enrofloxacin das erste Fluorchinolone für die Veterinärmedizin zugelassen (GROHE, 1998; APPELBAUM und HUNTER, 2000). In Abb. 4 sind die derzeit zur Behandlung von Milchkühen zugelassenen Fluorchinolone dargestellt.



**Abbildung 4:** Strukturformeln von Fluorchinolonen, die für Rinder, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird, zugelassen sind

### 2.2.5.3 Pharmakokinetik

Fluorchinolone zeichnen sich im Vergleich zu anderen Antibiotika wie etwa  $\beta$ -Lactamen oder Aminoglykosiden durch ein zehnfach so hohes Verteilungsvolumen im Gewebe aus. Aufgrund der daraus resultierenden intrazellulären Anreicherung sind Fluorchinolone sowohl gegen extra- wie auch gegen intrazellulär gelegene Erreger einsetzbar (AKTORIES et al., 2005; SCHMIDT, 2007). Da die Resorptionsrate aus dem Magen-Darm-Trakt bei den meisten Vertretern hoch ist, sind sie sehr gut für die orale Therapie geeignet. Die Bioverfügbarkeit liegt dabei mit Ausnahme von Norfloxacin bei 85 % (BURGIS, 2005; LÖSCHER et al., 2006) Nach einer Halbwertszeit von zumeist drei bis zwölf Stunden werden die

Fluorchinolone überwiegend über die Nieren ausgeschieden (STEIN, 1988). Die Metabolisierungsrate variiert sehr stark zwischen den einzelnen Wirkstoffen. So wird zum Beispiel Enrofloxacin zu 40 % in der Leber zu Ciprofloxacin deethyliert, das dann wiederum zu 15 bis 20 % zu unterschiedlichen, zum Teil auch antibakteriell wirksamen Metaboliten abgebaut wird (KROKER, 1999; AKTORIES et al., 2005). Was von den Fluorchinolonen oder deren Metaboliten nicht renal eliminiert wird, wird biliär sezerniert und mit den Faeces ausgeschieden. Bei neueren Chinolonen ist dies aufgrund einer höheren Lipophilie und der daraus resultierenden tubulären Rückresorption auch ein bedeutender Eliminationsweg (SÖRGEL et al., 2002).

#### **2.2.5.4      Therapeutische Anwendung beim Rind**

Die Fluorchinolone haben in der Praxis in den vergangenen Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Während im Jahre 1997 die Fluorchinolone nur 1 % der in der EU und der Schweiz eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffe ausmachten (BOATMAN, 1998), gaben bei einer von LAUEN (2006) durchgeführten Umfrage 90 % der bayerischen Rinderpraktiker an, Chinolone in ihrer Praxis einzusetzen.

Fluorchinolon-Präparate für adulte Rinder sind nur als parenteral zu verabreichende Mittel auf dem Markt. Entsprechend des breiten Wirkspektrums können diese Präparate gegen eine Vielzahl von Erregern eingesetzt werden, so unter anderem auch zur Therapie von durch *E. coli* verursachten Mastitiden (EUROVET, 2007). Bei der Mastitistherapie sollte jedoch beachtet werden, dass gerade Enrofloxacin zwar rasch vom Serum in die Milch übertritt, ausreichend hohe und lange Wirkspiegel aber nur gegenüber Enterobakterien und Staphylokokken, nicht aber bei Streptokokkeninfektionen zu erwarten sind (WALSER et al., 1993). Bis vor kurzem noch erhältliche Uterusstäbe mit dem Wirkstoff Enrofloxacin sind mittlerweile nicht mehr im Handel. Ebenso gibt es in Deutschland für Rinder keine Präparate auf Basis des eigentlich zugelassenen Wirkstoffs Flumequin (LÖSCHER et al., 2006; EUROVET, 2007).

### **2.2.5.5 Resistenzlage**

Generell ist die Resistenzlage gegenüber Fluorchinolonen noch günstig, jedoch ist ein partieller Anstieg der Resistenzen bei Zoonoseerregern wie *E. coli*, *Salmonella* oder *Campylobacter* zu beobachten (LÖSCHER et al., 2006). So stellten PIRRO et al. (1999) bei aus Broilern entnommenen *E.coli*- und *Salmonella*-Stämmen noch eine Resistenzquote von 6,4 % fest und auch WALLMANN (2004) spricht nur von einzelnen Resistenzfällen. KRESKEN et al. (2002 und 2006) konnten jedoch zwischen den beiden Veröffentlichungen einen Anstieg der resistenten *E.coli*-Stämme gegenüber Ciprofloxacin von 7,7 % auf 21,9 % feststellen. Auch das BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2003) verzeichnet eine starke Zunahme chinolon-resistenter *Salmonella*- und *E. coli*-Keime in Geflügelbetrieben, was auf die weitverbreitete Behandlung ganzer Bestände zurückgeführt wird.

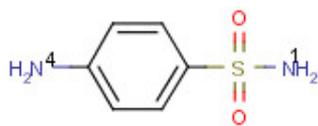
### **2.2.6 Sulfadiazin**

#### **2.2.6.1 Allgemeines**

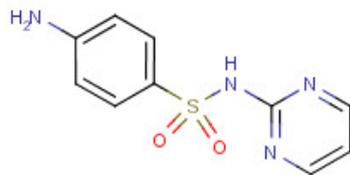
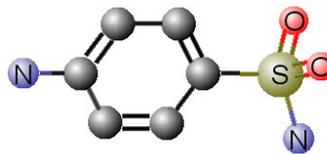
Sulfadiazin gehört zur Gruppe der Sulfonamide, mit deren Einführung die Ära der antibakteriellen Chemotherapie eingeleitet wurde. Gerhard Domagk entdeckte 1935 als damaliger Leiter des Pathologischen Instituts der I. G. Farbenindustrie Elberfeld (heute: Bayer AG) die Heilwirkung eines neu synthetisierten Azofarbstoffes, *Prontosil rubrum*, bei Streptokokkeninfektionen. Noch im gleichen Jahr konnten mehrere europäische Arbeitsgruppen nachweisen, dass die Wirkstoffkomponente p-Aminobenzolsulfonamid (Sulfanilamid) für den antibakteriellen Effekt verantwortlich ist. Die daraufhin einsetzende gezielte Synthese neuer Verbindungen führte zur Entwicklung einer großen Anzahl von antibakteriell wirksamen Sulfonamiden, förderte jedoch auch bei vielen Spezies die Entwicklung von Resistenzen, so dass diese Wirkstoffgruppe, auch im Zuge neu entwickelter Antibiotika, an Bedeutung verlor. Durch die Kombination mit Trimethoprim seit dem Jahre 1965 stieg der Einsatz von Sulfonamiden in der Therapie wieder an. Für seine Forschungsarbeit erhielt Domagk 1939 den Nobelpreis für Medizin (DOMAGK, 1935; AKTORIES et al., 2005).

### 2.2.6.2 Struktur und Synthese

Wie auch bei den Chinolonen handelt es sich bei den Sulfonamiden um synthetisch hergestellte Antiinfektiva und zwar um Amide des oben erwähnten Sulfanilamids, so dass eigentlich „Sulfanilamide“ die korrekte Bezeichnung für diese Wirkstoffklasse wäre. Ausschlaggebend für die antibakterielle Wirkung ist die freie Aminogruppe in Parastellung am N<sub>4</sub>. Finden an dieser Stelle Substitutionen statt, entstehen schwer resorbierbare, unwirksame Stoffe. Substitutionen an der N<sub>1</sub>-Position hingegen verändern die pharmakokinetischen Eigenschaften des Wirkstoffes (AKTORIES et al., 2005; LÖSCHER et al., 2006). Abb. 5 zeigt die Struktur von Sulfanilamid und des Derivats Sulfadiazin.



Sulfanilamid



Sulfadiazin



**Abbildung 5:** Strukturformeln von Sulfanilamid und Sulfadiazin

### **2.2.6.3 Pharmakokinetik**

Mit einer Halbwertszeit von 7 bis 12 Stunden gehört Sulfadiazin zu den mittellang wirkenden Sulfonamiden. In der Leber wird es an der N<sub>4</sub>-Position acetyliert, wodurch unwirksame Metaboliten entstehen, die aber stärker nephrotoxisch sind als die unveränderte Substanz. In geringem Maße finden auch Glucuronidierungen, Hydroxylierungen und andere Stoffwechselreaktionen statt. Über 90 % der Sulfonamide und ihrer Metaboliten werden durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sezernierung renal eliminiert (MUTSCHLER et al., 2001; AKTORIES et al. 2005; LÖSCHER et al., 2006). Da die Blut-Milch-Schranke überwunden wird, ist aber auch eine Ausscheidung über das Euter möglich (BURGIS, 2005).

### **2.2.6.4 Therapeutische Anwendung beim Rind**

Die Sulfonamide werden heute beim Rind ebenso wie beim Menschen hauptsächlich oral angewendet. Dies ist zum einen auf die gute Bioverfügbarkeit von über 90 % nach oraler Gabe zurückzuführen. Dabei sollte die Dosis jedoch nicht zu hoch sein, da dies beim ruminierenden Rind zu einer vorübergehenden Hemmung der Zelluloseverdauung führen kann. Zum anderen können intramuskuläre bzw. subkutane Injektionen zu lokalen Irritationen führen, so dass dazu geraten wird, allenfalls Initialdosen auf diese Weise zu verabreichen (LÖSCHER et al., 2006).

Während Sulfadiazin beim Menschen nur noch als Monopräparat bei der Toxoplasmose-Therapie Anwendung findet, sind in der Veterinärmedizin für die therapeutische Anwendung bei Kälbern Kombinationspräparate mit Trimethoprim bzw. mit Oxytetracyclin erhältlich. Für adulte Rinder ist ein Sulfadiazin-Trimethoprim-Präparat zur intrauterinen Anwendung auf dem Markt (EUROVET, 2007).

### **2.2.6.5 Resistenzlage**

Resistenzen gegenüber Sulfonamiden treten im gesamten Wirkungsspektrum auf. So fanden PIRRO et al. (1999) heraus, dass 48,8 % der *E. coli*- und *Salmonella*-Stämme, die sie aus Broilern isoliert hatten, resistent gegen die Kombination aus Trimethoprim und Sulfadiazin waren. Laut LÖSCHER et al. (2006) sind 55 % der bakteriellen Pneumonieerreger beim Kalb resistent gegenüber Sulfonamiden. KRABISCH et al. (1999) wiederum isolierten bei ihrer Resistenzstudie Keime aus bayerischen Milchviehherden mit und ohne Mastitisproblemen und testeten diese auf Resistenzen gegenüber Sulfamethoxazol und Trimethoprim, der in der Humanmedizin am häufigsten eingesetzten Sulfonamid-Trimethoprim-Kombination (AKTORIES et al., 2006). Dabei stellten sie fest, dass bei dieser Wirkstoffkombination lediglich Enterokokken Resistenzquoten von über 10 % aufwiesen.

## **2.3 Nachweisverfahren**

### **2.3.1 Allgemeines**

Zum Nachweis von Arzneimittelrückständen in Milch stehen mikrobiologische, physikalisch-chemische sowie immunologische Verfahren zur Verfügung. Unter den mikrobiologischen Methoden sind auch diejenigen zu finden, die in der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB beschrieben sind. Bei den physikalisch-chemischen Untersuchungen unterscheidet man colorimetrische, spektrophotometrische und chromatographische Verfahren, wobei letztgenannte für den Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden die größte Bedeutung besitzen (MITCHELL et al., 1998). Tab. 4 gibt einen Überblick über gängige mikrobiologische und physikalisch-chemische Testsysteme. Für ausführlichere Beschreibungen der aufgeführten Methoden sei an dieser Stelle auf frühere am Lehrstuhl angefertigte Dissertationsarbeiten zu diesem Themenkomplex verwiesen (LOCHBIHLER, 1994; STRASSER, 2003; GÄRTNER, 2006; QUANDT, 2006). Auf die immunologischen Verfahren wird in 2.3.2 noch genauer eingegangen. Wie bereits erwähnt, gibt es derzeit aber noch kein Verfahren, mit dem alle Antiinfektiva gleichermaßen unterhalb des jeweiligen MRL-Wertes nachzuweisen wären.

**Tabelle 4:** Überblick über gängige mikrobiologische und physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Antibiotika- und Sulfonamid-Rückstände in Milch

Testart	Gruppe	Nachgewiesene Antiinfektiva	Bemerkungen	Referenz
Blättchentest / BRT	mikrobiologische Hemmstofftests ( <i>B. stearothermophilus</i> )	Hauptsächlich $\beta$ -Lactame (durch Zugabe von Penicillinase oder p-Aminobenzoesäure ist ein Gruppennachweis möglich)	Es handelt sich dabei z. T. um amtliche Untersuchungsmethoden. Die Auswertung erfolgt visuell, eine Quantifizierung ist nicht möglich.	MITCHELL et al. (1998); NEAVES (1999a)
Delvotest	mikrobiologischer Hemmstofftest (Röhrchendiffusionstest, <i>B. stearothermophilus</i> )	Hauptsächlich $\beta$ -Lactame (je nach Version des Tests werden andere Stoffe, v. a. Sulfonamide, auch in Konzentrationen nahe ihrem MRL-Wert erfasst)	Der Nachweis von Hemmstoffen erfolgt durch den Farbumschlag eines pH-Indikators.	NEAVES (1999b); GDCH (2002)
Charm II	mikrobiologischer Rezeptorbindungstest (Schnelltest)	Je nach Rezeptor können $\beta$ -Lactame, Sulfonamide, Tetracycline, Aminoglykoside oder Makrolide sensitiv nachgewiesen werden	Der Nachweis beruht auf einer Bindungsreaktion zwischen einer Rezeptorstelle und der funktionellen Gruppe des Antiinfektivums.	CHARM und CHI (1988); JUNG (1996)

Fortsetzung Tab. 4

<b>Testart</b>	<b>Gruppe</b>	<b>Nachgewiesene Antiinfektiva</b>	<b>Bemerkungen</b>	<b>Referenz</b>
Dünnschicht-, Gas- und Flüssigkeits- chromato- graphie	physikalisch-chemische Nachweisverfahren	Penicilline, Aminoglykoside, Sulfonamide, usw.; es sind sowohl Einzel- als auch Gruppennachweise möglich.	Die chromatographischen Verfahren besitzen eine große Sensitivität gegenüber den nachzuweisenden Substanzen und ermöglichen auch eine Quantifizierung. Bedingt durch einen erheblichen Arbeitsaufwand und hohe Kosten eignen sie sich jedoch nicht für die Routinediagnostik.	MITCHELL et al. (1998)

### 2.3.2 Immunologische Verfahren

Immunologische Nachweisverfahren beruhen auf der Bindung von Antikörpern an spezifische Antigene. Durch die Kopplung eines der Reagenten an radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) oder lumineszierende (Lumineszenzimmunoassay, LIA) bzw. fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay, FIA) können die Reaktionen qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Bei EIAs werden vorwiegend Meerrettichperoxidase (HRP) und alkalische Phosphatase als Markerenzyme verwendet (MÄRTLBAUER, 1993).

Die enzymimmunologischen Verfahren können in kompetitive und nicht kompetitive Systeme unterschieden werden, wobei für den Nachweis niedermolekularer Substanzen, zu denen Antibiotika und Sulfonamide gerechnet werden, bisher nur kompetitive Tests zur Verfügung stehen. Je nachdem, ob nach einzelnen Bindungsschritten ungebundene Reagenzien wieder entfernt werden oder nicht, ist zusätzlich noch eine Einteilung in heterogene (mit Separationsschritt) und homogene Systeme möglich. Grundsätzlich können alle immunologischen Verfahren nach den oben aufgeführten Kriterien unterschieden werden (EKINS, 1985; MÄRTLBAUER, 1993).

Von den Enzymimmuntests sind für den Nachweis von Antiinfektiva hauptsächlich kompetitive heterogene Verfahren interessant. Dabei konkurrieren markierte und unmarkierte Antigene um eine definierte Anzahl Antikörperbindungsstellen. Werden festphasengebundene Antikörper verwendet, spricht man von direkten Testsystemen. Diese können anhand der zeitlichen Anordnung der Inkubationsschritte wiederum in konsekutive und simultane Verfahren eingeteilt werden, je nachdem, ob markierte und unmarkierte Antigene nacheinander (konsekutiv) oder gleichzeitig (simultan) mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert werden. Dieser Antikörper kann entweder unmittelbar oder über einen zweiten tierartspezifischen Antikörper (Double Antibody Solid Phase, DASP) an die Mikrotiterplatte gebunden sein. Handelt es sich um einen indirekten Test, so ist das markierte Antigen (in der Regel als Hapten-Protein-Konjugat) als Festkörperphase an die Platte gebunden. Sowohl beim direkten als auch beim indirekten Verfahren können noch homologe und heterologe Kombinationen von Antiserum und Enzymkonjugat unterschieden werden. Von einer homologen Kombination spricht man, wenn zur Immunogensynthese wie für die Herstellung

des markierten Antigens das gleiche Hapten benutzt wurde. Dagegen wird beim heterologen Verfahren zur Herstellung der Enzym- und Festphasenkonjugate ein anderes Hapten (heterologes Hapten), ein anderes Kopplungsreagenz (heterologe Brücke) oder eine andere Position am Molekül (heterologe Seite) zur Kopplung verwendet (MÄRTLBAUER, 1993).

Beim direkten Verfahren wird die Menge an gebundenem enzymmarkierten Antigen bestimmt. Im Gegensatz dazu erfolgt bei indirekten Tests der Nachweis gebundener Antikörper über enzymmarkierte Sekundärantikörper. In beiden Fällen werden die Bindungsreaktionen durch die Zugabe eines enzymespezifischen Substrates sichtbar. Je mehr Antigene sich in der Ausgangsprobe befanden, desto geringer fällt der Substratumsatz aus. Damit verhält sich das Testergebnis umgekehrt proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens.

Die enzymimmunologischen Verfahren zeichnen sich in der Regel durch eine hohe Sensitivität und, je nach verwendeten Immunreagenzien, Spezifität aus. Sie eignen sich daher sowohl für Screenings als auch zur Bestätigung der Ergebnisse vorausgegangener Tests. Jedoch raten GAUDIN et al. (2004) dazu, positive Resultate noch durch physikalisch-chemische Untersuchungen abzusichern. Die große Bedeutung dieser Methodik spiegelt sich in der Anzahl der Studien wieder, die sich in den vergangenen Jahren mit diesem Thema beschäftigt haben. So findet durch Variationen im Versuchsaufbau und bei den eingesetzten Puffern und Lösungen sowie durch die Entwicklung neuer Antikörper eine stetige Weiterentwicklung der EIA-Technik statt (ABUKNESHA und LUK, 2005; ERMOLENKO et al., 2007; PASTOR-NAVARRO et al., 2007). Tab. 5 zeigt verschiedene Untersuchungen, die in jüngerer Vergangenheit mit enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis verschiedener Antiinfektiva in Milch durchgeführt wurden.

Auf Basis der klassischen immunologischen Verfahren wird beständig nach neuen Möglichkeiten geforscht, Arzneimittelrückstände in der Milch nachzuweisen. So haben in den vergangenen Jahren vermehrt Biosensoren, bestehend aus einer biologischen (Antikörper, Lektine, DNS, Zellen) und einer physikalischen Komponente (Transducer), Einzug in die Rückstandsanalytik gehalten. Aufgabe des Transducers ist es dabei, den biochemischen bzw. biophysikalischen Vorgang in ein elektrisches Signal umzuwandeln und verstärkt an eine elektronische Messeinheit weiterzuleiten. Beispielfhaft sei hier ein von 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 entwickeltes System aufgeführt, dessen biologische Komponente auf einem klassischen kompetitiven Enzymimmuntest beruht. Die physikalische Komponente stellt eine hochempfindliche CCD-Kamera dar, die das bei der Antigen-Antikörper-Reaktion entstehende Lichtsignal detektiert und an ein integriertes Steuerungs-Laptop transferiert (MÄRTLBAUER et al., 2002; KNECHT et al., 2004).

Darüber hinaus gibt es eine ganze Reihe von kommerziellen Schnelltests, die auf der Verwendung spezifischer Bindungsproteine für Antibiotika bzw. Sulfonamide beruhen. Stellvertretend seien hier die indirekt kompetitiven Rezeptorbindungstests  $\beta$ -s.t.a.r. (Chr. Hansen GmbH) und Charm ROSA (MCS Diagnostics) genannt. Beide Systeme benutzen für den Nachweis Rezeptor-Goldkonjugate. Dieses Prinzip ist zwar etwas weniger sensitiv als EIAs, dafür ist eine Auswertung innerhalb weniger Minuten möglich (JIN et al., 2005). Die einfache Durchführung und das reduzierte Equipment ermöglichen auch einen Einsatz durch den Milcherzeuger selbst.

**Table 5:** Zusammenstellung ausgewählter neuerer Arbeiten zum Nachweis von Antiinfektiva in Milch mittels Enzymimmuntests

<b>Immunogen</b>	<b>Antikörper</b>	<b>EIA- Verfahren</b>	<b>Nachweisgrenze (ng/ml)</b>	<b>Kreuzreaktionen (%)</b>	<b>Referenz</b>
Enrofloxacin-(NHS)-HSA	mAk (Maus)	indirekt	1,0	----	WATANABE et al. (2002)
Streptomycin-(cc)-BSA	pAk (Schaf)	indirekt	3	Dihydrostreptomycin (75)	ABUKNESHA und LUK (2005)
Gentamicin-(EDC)-KLH	mAk (Maus)	direkt	0,5	----	JIN et al. (2005)
Streptomycin-ADH-(EDC)- BSA; Streptomycin-CMO- BSA	pAk (Kaninchen)	direkt	3,2	Dihydrostreptomycin (100)	SAMSONOVA, et al. (2005a)
Ampicillin-(EDC)-BSA	pAk (Kaninchen)	indirekt	50	Penicillin G (10) Azlocillin (17)	SAMSONOVA, et al. (2005b)
Kanamycin-(EDC)-KLH	mAk (Maus)	direkt	1,0	----	JIN et al. (2006a)

Fortsetzung Tab. 5

<b>Immunogen</b>	<b>Antikörper</b>	<b>EIA- Verfahren</b>	<b>Nachweisgrenze (ng/ml)</b>	<b>Kreuzreaktionen (%)</b>	<b>Referenz</b>
Neomycin-KLH	mAk (Maus)	direkt	2,73	----	JIN et al. (2006b)
Neomycin-(EDC)-BSA; Neomycin-(G)-BSA; Neomycin-(EDC)-HSA	pAk (Kaninchen)	indirekt	0,69	----	CHEN et al. (2007)
Gentamicin-(EDC)-BSA; Gentamicin-(sulpho-NHS)- BSA	pAk (Kaninchen)	direkt	6,53	----	DIANA et al. (2007)
Neomycin-(EDC)-BSA; Neomycin-(sulpho-NHS)- BSA	pAk (Kaninchen)	direkt	48,5	----	DIANA et al. (2007)
SAB-(NHS)-OVA; SAB-(NHS)-STI	pAk (Kaninchen)	indirekt	0,1 - 37	Sulfamerazin (574) Sulfathiazol (450) Sulfadiazin (300) Sulfamethoxazol (123) Sulfamethazin ( 92)	ERMOLENKO et al. (2007)

Fortsetzung Tab. 5

<b>Immunogen</b>	<b>Antikörper</b>	<b>EIA- Verfahren</b>	<b>Nachweisgrenze (ng/ml)</b>	<b>Kreuzreaktionen (%)</b>	<b>Referenz</b>
Ampicillin-BSA	pAk	direkt	1 – 2,9	Nafcillin (144) Amoxicillin (94) Cloxacillin (69) Penicillin G (56) Dicloxacillin (52) Oxacillin (51)	FITZGERALD et al. (2007)
Tetracyclin-BSA	pAk (Schaf)	indirekt	0,48	Chlortetracyclin (13,7) Oxytetracyclin (10)	JEON et al. (2008)

*Abkürzungsverzeichnis zu Tab. 4:*

ADH	Adipin-Hydrazid	KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin	mAk	monoklonaler Antikörper
cc	Cyanurchlorid	NHS	N-Hydroxysuccinimid
CMO	Carboxymethoxylamin	OVA	Ovalbumin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl	pAk	polyklonaler Antikörper
HSA	Humanes Serumalbumin	SAB	N-Sulfanyl-4aminobutyric-Säure
k. A.	keine Angaben	STI	Soja-Trypsin-Inhibitor

### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Materialien und Geräte**

##### **3.1.1 Chemikalien und Biochemika**

Casein (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-8654
Magermilchpulver	Oxoid Ltd., LP0031
Methanol	Fluka Chemie GmbH, 65543
Natronlauge (1 mol/l)	Mallinckrodt Baker B.V., 7097
Schwefelsäure (95-97 %)	Fluka Chemie GmbH, 84720
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-2855
Tween®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-1379

##### **3.1.2 Antibiotika und Sulfonamide**

Ciprofloxacin	Sequoia Res. Prod. Ltd., SPP03565c
Cloxacillin (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-9393
Gentamicin-Sulfat	Serva Electrophoresis GmbH, 22185
Neomycin-Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, N-5285
Penicillin G (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-3032
Streptomycin-Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, S-6501
Sulfadiazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, S-8626
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-3383

Die oben aufgeführten Antibiotika und Sulfonamide wurden zur Herstellung der Standard-Stammlösungen (1 mg/ml) in 5 ml-Glasflaschen abgewogen und unter Berücksichtigung des Salzanteils im entsprechenden Volumen PBS gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit von Ciprofloxacin und Sulfadiazin wurden bei diesen Substanzen jeweils ca. 10 % der PBS-Menge durch NaOH (1 mol/l) ersetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden in mit A. dest. rekonstituiertem Magermilchpulver (10 % g/v; 10 % MM), hemmstofffreier Rohmilch oder

PBS Verdünnungsreihen zur Erstellung von Standardkurven angefertigt. Die Penicillin-G-Stammlösung wurde als Positivkontrolle für den BRT-MRL-Suchtest verwendet. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe in Konsumvollmilch bzw. hemmstofffreier Rohmilch angefertigt. Die Stammlösungen wurden in der Regel am jeweiligen Untersuchungstag frisch hergestellt. In Einzelfällen wurde die Stammlösung noch maximal zwei Tage nach der Herstellung (Lagerung bei 4 °C) verwendet. Die fertigen Verdünnungsreihen von Ciprofloxacin, Cloxacillin, Gentamicin, Streptomycin und Sulfadiazin konnten abgefüllt in 2 ml-Eppendorf-Tubes bei -18 °C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, ohne die Ergebnisse der EIA's zu beeinträchtigen.

### **3.1.3 Puffer und Lösungen**

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

1 % bzw. 2 % Casein-PBS-Lösung (10 g bzw. 20 g Natriumcaseinat/l PBS)

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

1 mol/l Schwefelsäure

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l  
Natriumchlorid, pH 7,3

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

Waschlösung: 0,15 mol/l Natriumchlorid mit Zusatz von 0,025 % Tween®20

Substrat-/Chromogenlösung nach GALLATI und PRACT (1985):

20 Teile Citratpuffer mit einem Teil Tetramethylbenzidinlösung

### **3.1.4 Immunreagenzien**

Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörper                      Dako, Z 0259

Kaninchen-Anti-Maus-IgG-HRP                              Dako, P 0161

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP                        Dako, P 0217

Polyklonale Kaninchenantiseren (pAk) gegen Ampicillin, Sulfadiazin und Tetracyclin, sowie monoklonale Antikörper (mAk) zum Nachweis von Fluorchinolonen, Streptomycin und Cloxacillin wurden im Rahmen früherer Untersuchungen am Institut entwickelt. Eine Zusammenstellung der verwendeten Antikörper ist Tab. 6 zu entnehmen. Die Gewinnung der Antikörper wurde in den angegebenen Referenzen beschrieben.

Folgende Antigen-Protein-Konjugate wurden für die Durchführung der Enzymimmuntests benötigt:

Cloxacillin-C-GOD	Die Kopplung an Glukoseoxidase erfolgte mittels aktivem Ester nach USLEBER et al. (1994).
Clinafloxacin-PJ-HRP	Clinafloxacin wurde mittels Natriumperjodat-Methode (PJ) nach GÄRTNER (2006) an HRP gekoppelt.
Gentamicin-BSA	Kommerziell bezogenes Antigen-Protein-Konjugat von ACRIS ANTIBODIES GMBH (2007, CH-2032).
Neomycin-BSA	Kommerziell bezogenes Antigen-Protein-Konjugat von ACRIS ANTIBODIES GMBH (2007, CH-2021).
Ampicillin-EDC-HRP	Die Kopplung erfolgte mittels Carbodiimidmethode [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, EDC] nach STRASSER (2003).
Streptomycin-ABH-HRP	Die Kopplung erfolgte über 4-Aminobenzoylhydrazid nach SCHNAPPINGER et al. (1993).
Sulfadiazin-BQ-HRP	Die Synthese des Antigen-Protein-Konjugats erfolgte mittels Benzoquinon-Kopplung nach OSTERMAIER (1994).
Tetracyclin- $\beta$ -Casein	Die Synthese des Antigen-Protein-Konjugats erfolgte durch Kopplung mit Formaldehyd nach LANG et al. (1992).

**Tabelle 6:** Übersicht zu den für die Erstellung der Enzymimmuntests eingesetzten Antikörpern, sowie Angaben zu deren Spezifität (relevante Kreuzreaktionen)

Analyt	Antikörper	rel. Kreuzreaktionen (%)	Referenz	
Cloxacillin	mAk CloxaII1F7	Cloxacillin	100	DIETRICH et al. (1996)
		Dicloxacillin	330	
		Oxacillin	11	
Fluorchinolone	mAk NorIII1F7	Ciprofloxacin	100	DIETRICH et al. (2008)
		Enrofloxacin	510	
		Marbofloxacin	370	
		Danofloxacin	171	
		Flumequin	77,9	
Gentamicin	mAk CH-2021	Gentamicin	100	ACRIS ANTIBODIES GMBH (2007)
Neomycin	mAk CH-2032	Neomycin	100	ACRIS ANTIBODIES GMBH (2007)
Penicillin G	pAk 170 <sub>Pool</sub>	Penicillin G	100	STRASSER (2003); STRASSER et al. (2003)
		Ampicillin	64	
		Amoxicillin	24	
		Oxacillin	100	
		Cloxacillin	29	
		Dicloxacillin	27	
		Nafcillin	120	
Streptomycin	mAk StrepII4E2	Streptomycin	100	MÄRTLBAUER et al. (1994)
		Dihydrostreptomycin	76,2	
Sulfadiazin	pAk 32 <sub>Pool</sub>	Sulfadiazin	100	MEIER (1991); MÄRTLBAUER et al. (1992)
		Sulfamerazin	11,1	
		Sulfathiazol	10,9	
Tetracyclin	pAk 91 <sub>Pool</sub>	Tetracyclin	100	LANG et al. (1992)
		Chlortetracyclin	86,9	
		Oxytetracyclin	3,8	

### 3.1.5 Geräte und Instrumente

#### Allgemein

Magnetrührer	IKA-COMBIMAG-RET, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG
Präzisions-Heizplatte	PZ 281, Präzitherm
Präzisions-Waage	R200 D, Sartorius AG
Vortex	Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R, Heraeus

#### Enzymimmuntests

EIA-Autoreader	Sunrise, Tecan Deutschland GmbH
Mikroprozessor pH-mV-Meter	pH 526, WTW GmbH
Mikrotiterplattentaumelgerät	Polymax 1040, Heidolph GmbH

#### Immunaффinitätschromatographie

Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC2-25	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
---------------------------------------	--

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

#### Allgemein

PS-Röhrchen, 12 ml	160101, Greiner bio-one
PP-Röhrchen, 50 ml	227261, Greiner bio-one
Eppendorf-Tubes, 2 ml	32236, Eppendorf AG

#### Enzymimmuntests

Mikrotiterplatten	Immunoplate 439454, Nunc GmbH & Co. KG
-------------------	---

### Immunaффinitätschromatographie

595<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Faltenfilter, ø 110 mm  
Mobicol

10311643, Schleicher & Schuell GmbH  
M 1002, MoBiTec GmbH

### Mikrobiologische Tests

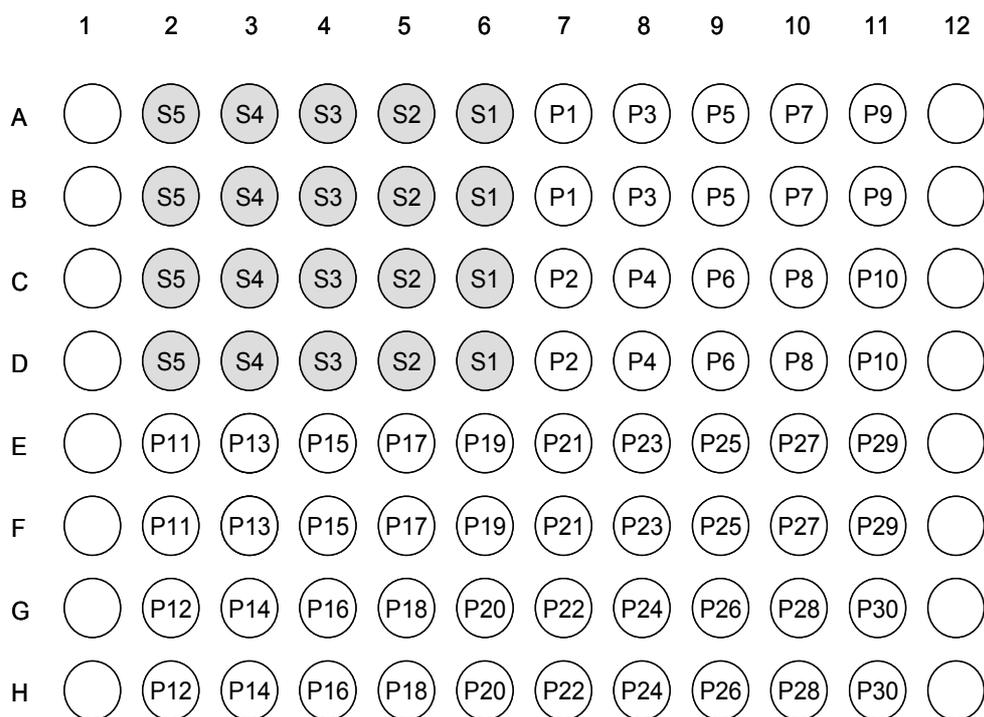
Mikrotiterplatten-Testsystem

MRL-Suchtest ESL, AiM Produktions- u.  
Vertriebs GmbH

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Probenmaterial und Aufbereitung**

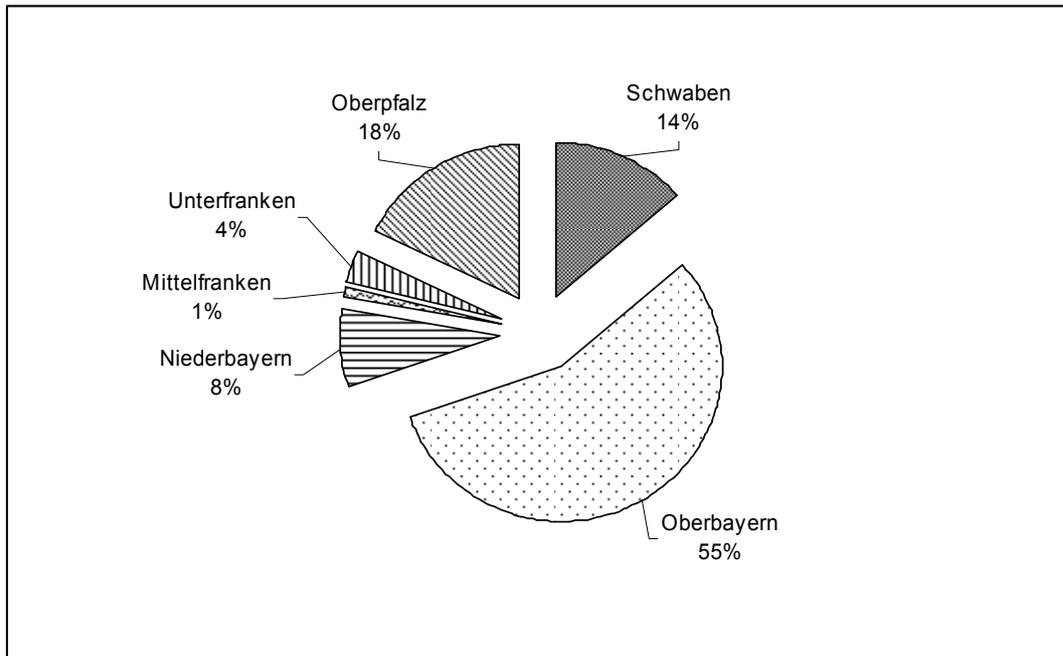
Von September 2005 bis Mai 2006 wurden 420 Tankmilchproben von einer bayerischen Molkerei zur Verfügung gestellt, die im Rahmen mehrerer Probennahme-Zyklen jeweils über einen Zeitraum von einer Woche Proben von den anliefernden Milchtankwägen zog und diese eingefroren bis zur Abholung vor Ort lagerte. Die Proben waren in Plastikgefäße in Mengen von ca. 50 – 200 ml abgefüllt, auf denen die Nummer des Tanks und das Anlieferungsdatum vermerkt waren. Auf diese Weise wurden von der Molkerei jeweils zwischen 145 und 210 Proben gesammelt, aus welchen wiederum die zu untersuchenden Proben ausgewählt wurden. Dabei lag das Hauptaugenmerk darauf, Tankwagen auszusuchen, von denen möglichst viele Proben von verschiedenen Anlieferungstagen vorlagen. Zudem wurde darauf geachtet, dass von jedem Tankwagen während des Untersuchungszeitraumes zumindest einmal Proben untersucht wurden. Die Aliquote der ausgewählten Proben wurden portioniert als Rückstellproben bei -18 °C gelagert. Parallel dazu wurden in mehrere Mikrotiterplatten entsprechend der in Abb. 6 dargestellten Anordnung von Standards und Proben für das EIA-Screening 2 mal 300 µl jeder Probe einpipettiert und die Platten für spätere Untersuchungen eingefroren.



**Abbildung 6:** Typische Anordnung von Standards (S1 bis S5) und Proben (P1 bis P30) auf einer Mikrotiterplatte beim EIA-Screening

Zusätzlich zu den Tankmilchproben wurden zwischen Mai und November 2006 insgesamt 198 Konsummilchproben für die Untersuchung auf Rückstände gesammelt. Über diesen Zeitraum verteilt wurden an acht Stichtagen jeweils zwischen 18 und 30 im Einzelhandel erhältliche Konsummilchpackungen eingekauft. Bei der Auswahl der Milchpackungen war entscheidend, dass die Milch von einer bayerischen Molkerei abgefüllt worden war, was anhand der Betriebsnummer auf dem Identitätskennzeichen sichergestellt werden konnte, und dass keine zwei Proben derselben Molkerei und derselben Charge untersucht wurden. Dies wurde mit Hilfe des aufgedruckten Mindesthaltbarkeitsdatums kontrolliert. Zudem wurde bei der Auswahl der Proben versucht, möglichst viele Molkereien und Marken abzudecken. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf Milch mit einem Fettgehalt von mind. 3,5 %. Vereinzelt wurden aber auch Proben von teilentrahmten Milchen (Fettgehalt 1,5 – 1,8 %) gezogen, um so das Spektrum der untersuchten Molkereien zu erweitern. Auf diese Weise konnten 198 Proben mit 32 unterschiedlichen Markenbezeichnungen von 12 bayerischen Molkereien in die

Untersuchung einbezogen werden. Die Verteilung der beprobten Molkereien auf die einzelnen Regierungsbezirke ist aus Abb. 7 ersichtlich. Eine genauere Differenzierung der untersuchten Proben im Hinblick auf die unterschiedlichen Erhitzungsverfahren und Fettgehalte ist Tab. 7 zu entnehmen.



**Abbildung 7:** Herkunft der untersuchten bayerischen Konsummilchproben ( $n = 198$ ). Die Zuordnung erfolgte anhand der auf dem Identitätskennzeichen angegebenen Betriebsnummer der Molkerei

**Tabelle 7:** *Aufschlüsselung der untersuchten Konsummilchproben im Hinblick auf Erhitzungsverfahren und Fettgehalt*

<b>Fettgehalt in Prozent</b>	<b>Frischmilch<sup>1</sup></b>		<b>H-Milch<sup>2</sup></b>		
	<b>1,5 – 1,8</b>	<b>mind. 3,5</b>	<b>1,5</b>	<b>3,3</b>	<b>3,5</b>
Anzahl der Proben	3	120	3	3	69
Anteil in Prozent	1,52	60,6	1,52	1,52	34,9
relativer Anteil am Probenpool	62,1		37,9		

<sup>1</sup> pasteurisierte, homogenisierte Kuhmilch

<sup>2</sup> ultrahocherhitzte, homogenisierte Kuhmilch (Fettgehalte 1,5 und 3,5 %) bzw. ultrahocherhitzte, homogenisierte Ziegenmilch (Fettgehalt 3,3 %)

### **3.2.2 Enzymimmunologische Nachweisverfahren**

#### **3.2.2.1 Allgemeines**

Bei der Durchführung des EIA-Screenings wurden sowohl direkte, als auch indirekte kompetitive Enzymimmuntests verwendet.

Die Belegung der verwendeten Mikrotiterplatten erfolgte für das Screening der Tankmilch wie in Abb. 6 dargestellt. Dabei bezeichnet S1 (Standard 1) den Leerwert (antigenfreier Kontrollansatz) und S5 (Standard 5) die Standardlösung mit der höchsten Antigenkonzentration. Da die Randreihen der Schmalseiten der Mikrotiterplatten oft größere Abweichungen zeigen, wurden die Spalten 1 und 12 nicht belegt. Als Leerwert und Verdünnungslösung für die Herstellung der Standards wurde hemmstofffreie Rohmilch verwendet. Diese stammte aus dem Lehr- und Versuchsgut der tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität in Oberschleißheim und wurde im Institut portioniert bis zur Verwendung bei -18 °C gelagert. Die Tankmilchproben wurden in den meisten Fällen ohne weitere Aufbereitung in die Tests eingesetzt, lediglich bei elf Nachuntersuchungen wurden die Proben zuvor durch Zentrifugieren (2.500 x g, 4 °C, 10 min) entfettet.

Die Proben für das Screening der Konsummilch wurden im Vierfach-Ansatz auf die Platte gegeben, die Standardlösungen für das Konsummilch-Screening wurden in 10 % MM hergestellt. Die Magermilchlösung wurde bei 4 °C gelagert und längstens bis zum dritten Tag nach der Herstellung noch verwendet.

Konsummilch- und Tankmilchproben, die im Screening-Verfahren als verdächtig erschienen, wurden nach demselben Prinzip nachuntersucht. Dabei wurden die Proben immer im Vierfach-Ansatz auf die Platte gegeben. Beim Screening der Konsummilchproben wurden zum Teil freie Kavitäten auf den Platten mit auffälligen Proben vorangegangener Untersuchungsgänge aufgefüllt. Bei der Untersuchung fraglicher Proben mit Hilfe separater Platten wurde versucht, immer eine oder mehrere Proben, die im Screening negativ auf das jeweilige Antibiotikum reagiert hatten, als zusätzliche Kontrolle mitzuführen.

Zur Durchführung der EIA-Tests wurden Mikrotiterplatten mit Antikörpern oder Antigen-Protein-Konjugaten bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die beschichteten Platten wurden dann bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert (mind. ein Tag, max. vier Wochen). Vor Gebrauch wurden die Platten, sowie alle anderen Reagenzien und Verdünnungslösungen auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurden freie Bindungsstellen für 30 Minuten mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung abgesättigt und nach einem Waschschriff (4 mal 300 µl pro Kavität) die jeweiligen testspezifischen Reagenzien (3.2.2.2 bis 3.2.2.5) aufgetragen.

Bei allen Tests wurde als Substrat/Chromogenlösung, wie in 3.1.3 beschrieben, eine Mischung aus Citratpuffer und Tetramethylbenzidinlösung verwendet. Nach einem Zeitraum von mindestens 5 und längstens 20 Minuten (je nach Farbentwicklung) wurde die Enzymaktivität mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Farbintensität der einzelnen Kavitäten im EIA-Autoreader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Zur

Auswertung der Daten und Erstellung der Standardkurven wurde eine von r-Biopharm vertriebene Software (RIDAWIN, Version 1.38) verwendet.

### 3.2.2.2 Enzymimmunologischer Nachweis von Fluorchinolonen

Beim eingesetzten enzymimmunologischen Nachweisverfahren für Fluorchinolone handelt es sich um einen simultan kompetitiven, direkten Enzymimmuntest. Der Test basiert auf der DASP-Technik (siehe 2.3.2), d.h. an die Mikrotiterplatte gebundene Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörper) dienen als Festphase, an die die gegen Fluorchinolone gerichteten Antikörper gebunden werden. Nach dem Absättigen der Platten konkurrieren freies Fluorchinolon und enzymmarkiertes Antigen (Clinafloxacin-PJ-HRP) um die freien Antikörperbindungsstellen, wobei zur Erstellung der Standardkurven Ciprofloxacin als freies Antigen eingesetzt wurde. Durch Waschen der Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen Reaktionsschritten werden nicht gebundene Reagenzien entfernt. Eine schematische Darstellung der Testdurchführung wird in Abb. 8 gezeigt.

Die optimale Konzentration der Immunreagenzien wurde mittels Schachbrettitration ermittelt, wobei angestrebt wurde, bei antigenfreien Kontrollansätzen Extinktionen von 0,8 bis 1,2 zu erreichen. Für den Nachweis von Fluorchinolonen in Tank- bzw. Konsummilch wurden die in Tab. 8 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt.

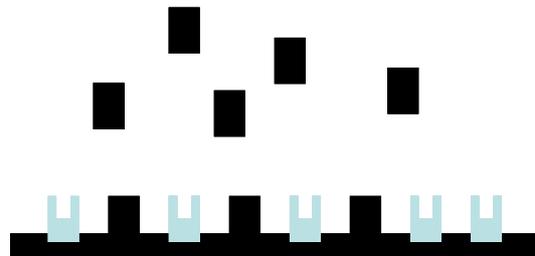
**Tabelle 8:** *Zum enzymimmunologischen Nachweis von Fluorchinolonen in Tank- bzw. Konsummilch eingesetzte Reagenzien*

<b>Probe</b>	<b>Verdünnungslösung</b>	<b>mAk NorIII1F7</b>	<b>Clinafloxacin-PJ-HRP</b>
	<b>für Standards</b>		
Tankmilch	Rohmilch	40 ng/ml	1 : 4.000
Konsummilch	10 % MM	80 ng/ml	1 : 16.000



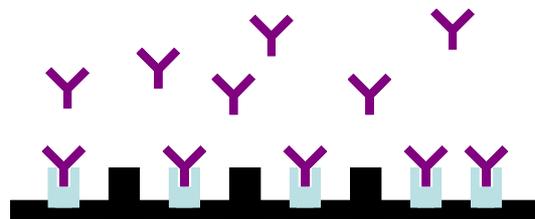
Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Anti-Maus-IgG-Antikörper (10 µg/ml Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität);

Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur



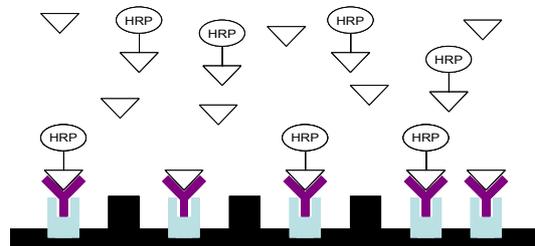
Absättigen freier Bindungsstellen mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität);

Inkubation 30 min



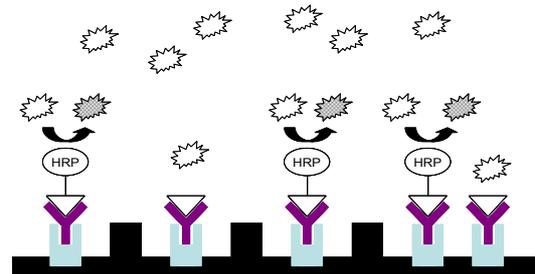
Zugabe des mAk NorIII1F7 in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung (100 µl/Kavität);

Inkubation 1 h



Simultane Zugabe (je 50 µl/Kavität) der Ciprofloxacin- Standards bzw. Proben und des Clinafloxacin-PJ-HRP in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung;

Inkubation 1 h



Zugabe von Substrat (100 µl/Kavität);

Inkubation 5 – 20 min;

Abstoppen der Enzymreaktion mit Schwefelsäure (100 µl/Kavität);

Messung der Extinktion bei 450 nm

**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Testdurchführung eines simultan kompetitiven, direkten Enzymimmuntests basierend auf der Doppel-Antikörper-Technik am Beispiel des Nachweises von Fluorchinolonen

### **3.2.2.3 Enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen, Cloxacillin, Gentamicin, Neomycin und Streptomycin**

Der enzymimmunologische Nachweis von Tetracyclin, Cloxacillin und den Aminoglykosiden Gentamicin, Neomycin und Streptomycin, erfolgte mittels eines kompetitiven, indirekten Testverfahrens. Hierbei werden die Mikrotiterplatten mit dem markierten Antigen (Antigen-Protein-Konjugat; 100 µl/Kavität) beschichtet. Zur Testdurchführung wurden die freien Bindungsstellen der Platten mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung blockiert, die Platten dann nach einer 30-minütigen Inkubationszeit 4 mal gewaschen und anschließend trockengeschlagen. Im nächsten Schritt wurden die Standardlösungen bzw. Proben und die spezifischen Antikörper (je 50 µl/Kavität) auf die Platte gegeben und für 1 h bei leichter Bewegung inkubiert. Nach einem weiteren Wasch- und Trockenschritt erfolgte die Zugabe enzymmarkierter Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-IgG-HRP bzw. Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP verdünnt in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung; 100 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation und erneutem Waschen erfolgte wie oben (3.2.2.1) beschrieben die Zugabe der Substrat-Chromogen-Lösung. Details zu den verwendeten Reagenzien sind in Tab. 9 aufgeführt.

Abweichend zum üblichen Vorgehen bei den EIA-Untersuchungen, wurden beim Nachweis von Tetracyclin die Proben nicht direkt eingesetzt, sondern im Verhältnis 1:30 mit PBS verdünnt. Analog dazu wurden auch die Standardlösungen in entsprechend konzentrierten Verdünnungslösungen (Rohmilch bzw. 10 % MM) angesetzt.

**Table 9:** *Indirekte kompetitive Enzymimmuntests zum Nachweis verschiedener Antibiotika*

Nachweis von	Untersuchung von	Antigen-Protein-Konjugat		Antikörper <sup>1</sup>		peroxidase markierte Sekundärantikörper <sup>2</sup>
		Konzentration	Verdünnungslösung	Bezeichnung	Konzentration	
Tetracyclin	Tankmilch	1.600 ng/ml	Bicarbonatpuffer	pAk 91 <sub>Pool</sub>	1 : 500	Schwein-Anti-Kaninchen-IgG
	Konsummilch					
Cloxacillin	Tankmilch	1.000 ng/ml	PBS-Puffer	mAk CloxaII1F7	12,5 ng/ml	Kaninchen-Anti-Maus-IgG
	Konsummilch	250 ng/ml	PBS-Puffer	mAk CloxaII1F7	50 ng/ml	
Gentamicin	Tankmilch	700 ng/ml	PBS-Puffer	mAk CH-2021	700 ng/ml	Kaninchen-Anti-Maus-IgG
	Konsummilch	600 ng/ml	PBS-Puffer	mAk CH-2021	600 ng/ml	
Neomycin	Tankmilch	600 ng/ml	PBS-Puffer	mAk CH-2032	150 ng/ml	Kaninchen-Anti-Maus-IgG
	Konsummilch					
Streptomycin	Tankmilch	1.500 ng/ml	PBS-Puffer	mAk StrepII4E2	100 ng/ml	Kaninchen-Anti-Maus-IgG
	Konsummilch					

<sup>1</sup> verdünnt in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung

<sup>2</sup> im Verhältnis 1:3.000 in 1 %-iger Casein/PBS-Lösung verdünnt

#### **3.2.2.4 Enzymimmunologischer Nachweis von Sulfadiazin**

Beim Nachweis von Sulfadiazin kam ein simultan kompetitiver, direkter Enzymimmuntest zur Anwendung. Hierbei werden im Gegensatz zu den in 3.2.2.2 beschriebenen EIA die Mikrotiterplatten direkt mit den spezifischen Antikörpern beschichtet, der weitere Ablauf erfolgt analog zu dem beschriebenen Verfahren. Für den EIA wurde das Sulfadiazin-Antiserum (pAk 32<sub>Pool</sub>) 1:4.000 in Bicarbonatpuffer verdünnt, als markiertes Antigen wurde ein Sulfadiazin-HRP-Konjugat in den Verdünnungen 1:80.000 für die Untersuchung von Tankmilch- bzw. 1:40.000 für die Untersuchung von Konsummilchproben verwendet.

#### **3.2.2.5 Enzymimmunologischer Nachweis von Penicillinen**

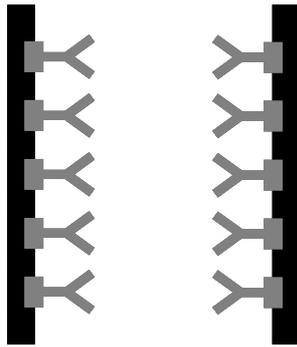
Auch beim durchgeführten enzymimmunologischen Testverfahren zum Nachweis von Penicillinen handelt es sich um einen simultan kompetitiven, direkten EIA. Dieser Test wurde nur für Proben verwendet, bei denen mittels des unten (3.2.4) beschriebenen mikrobiologischen Verfahrens Hinweise auf das Vorliegen von Hemmstoff-Rückständen erhalten wurden. Als Standardlösung wurde Penicillin G verdünnt in 10 % MM verwendet, die Charakteristika der eingesetzten Immunreagenzien (pAk 170<sub>Pool</sub>, Ampicillin-EDC-HRP) sind in 3.1.4 aufgeführt. Da für diesen EIA im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur wenige Daten generiert wurden, wurde in 3.3. auf eine statistische Auswertung der Reproduzierbarkeit des Testsystems verzichtet.

#### **3.2.3 Immunaffinitätschromatographie (IAC) für den Nachweis von Cloxacillin und Sulfadiazin**

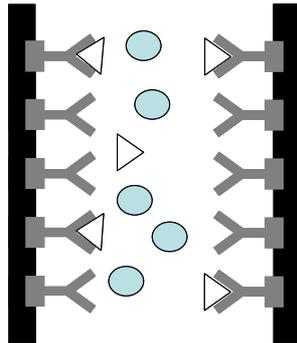
Proben, bei denen mittels der oben beschriebenen immunchemischen Untersuchungen Hinweise auf Rückstände von Cloxacillin und Sulfadiazin vorlagen, wurden unter Verwendung von Immunaffinitätssäulen analog zu den bei BEHMENBURG (1999) beschriebenen Verfahren weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mobicol-Kunststoff-Säulen mit jeweils 100 µl des entsprechenden Antikörper-Gels (Cloxa-II-1F7-Gel für Cloxacillin bzw. SDA-III-2G6-Gel für Sulfadiazin) bepackt. Daraufhin wurden die Säulen

mittels einer Einmalspritze mit 5 ml PBS-Puffer gespült, um das eingebrachte Gel zu verdichten. Zur Erhöhung der Lagerfähigkeit der Säulen wurden diese abschließend noch mit jeweils 5 ml PBS mit Zusatz von 0,1 %  $\text{NaN}_3$  gespült und bei 4 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

Zur Durchführung der Immunaффinitätschromatographie wurden die zu untersuchenden Proben zunächst durch Zentrifugation (2.500 x g, 4 °C, 10 min) entfettet und anschließend im Verhältnis 1:3 mit PBS-Puffer verdünnt. Dieser Ansatz wurde dann mittels Papierfilter von groben Bestandteilen gereinigt und 30 ml des Filtrats auf eine mit 10 ml PBS-Puffer vorgespülte IAC-Säule aufgetragen. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug ca. 1 ml/min, die durchgelaufene Lösung wurde separat aufgefangen (Probendurchlauf). Daraufhin wurde die Säule noch einmal mit 10 ml PBS-Puffer gespült und luftgetrocknet. Es folgte die Elution der Säule mit 3 ml Methanol. Abb. 9 zeigt eine schematische Darstellung der Durchführung der Immunaффinitätschromatographie. Das aufgefangene Eluat wurde dann im Rotationsverdampfer bei 60 °C zur Trockene eingeeengt, der Rückstand in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen und der so hergestellte Endextrakt in mehreren Verdünnungsstufen wie in 3.2.2.3 bzw. 3.2.2.4 beschrieben in die jeweiligen EIAs eingesetzt. Dabei wurden die Standardkurven ebenfalls in PBS-Puffer angelegt. Zur Kontrolle wurde auch der separat aufgefangene Probendurchlauf mit dem jeweiligen EIA untersucht, wobei dafür die Standardlösungen in einer Mischung aus entfetteter Milch und PBS (Mischungsverhältnis 1:3) angesetzt wurden.



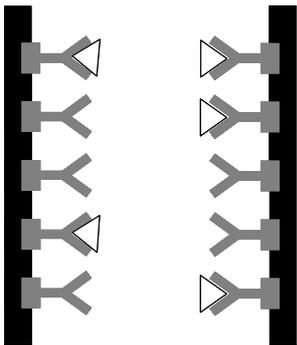
Gelmatrix mit immobilisierten Antikörpern (Cloxa-II-1F7 bzw. SDA-III-2G6)



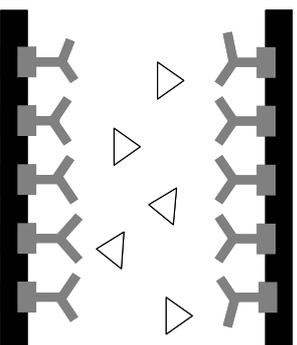
Zugabe von 10 ml Milch (mit 20 ml PBS verdünnt)

Der Durchlauf wird aufgefangen und in den EIA eingesetzt

▷ Antigen      ● nicht gebundene Probenmatrix



Spülen der Säule mit 10 ml PBS und anschließende Trocknung



Denaturierung der Antikörper durch Zugabe von 3 ml Methanol und Elution der gebundenen Analyten.

**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung von Milchproben zum Nachweis von Sulfadiazin bzw. Cloxacillin

### **3.2.4 Mikrobiologischer Nachweis mittels BRT-MRL-Suchtest**

Beim Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) handelt es sich um eine amtliche Untersuchungsmethode gem. § 64 Abs. 1 LFVG. Dieser Test eignet sich vor allem zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Die Nachweisgrenzen liegen laut Herstellerangaben (AIM, 2005) für die in der Veterinärmedizin gängigen Penicilline und den Großteil der Cephalosporine unter dem festgesetzten MRL-Wert.

Für die Untersuchung der Tankmilchproben wurde als Negativkontrolle bzw. zum Ansetzen der Positivkontrollen hemmstofffreie Rohmilch aus dem Lehr- und Versuchsgut der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in Oberschleißheim verwendet. Diese wurde bei der Untersuchung der Konsummilchproben durch Konsum-Vollmilch ersetzt, die sich bei institutsinternen Tests bereits als hemmstofffrei erwiesen hatte. Die Tankmilchproben wurden im Zweifach-Ansatz auf die Platte aufgetragen. Je nach Probenanzahl wurde bei der Untersuchung der Konsummilch die Anzahl der Kavitäten pro Probe auf drei oder vier erhöht. Proben, die beim ersten Test kein eindeutig negatives Ergebnis zeigten, wurden grundsätzlich im Vierfach-Ansatz nachuntersucht. Alle Proben wurden ohne vorherige Aufbereitung in den Test eingesetzt.

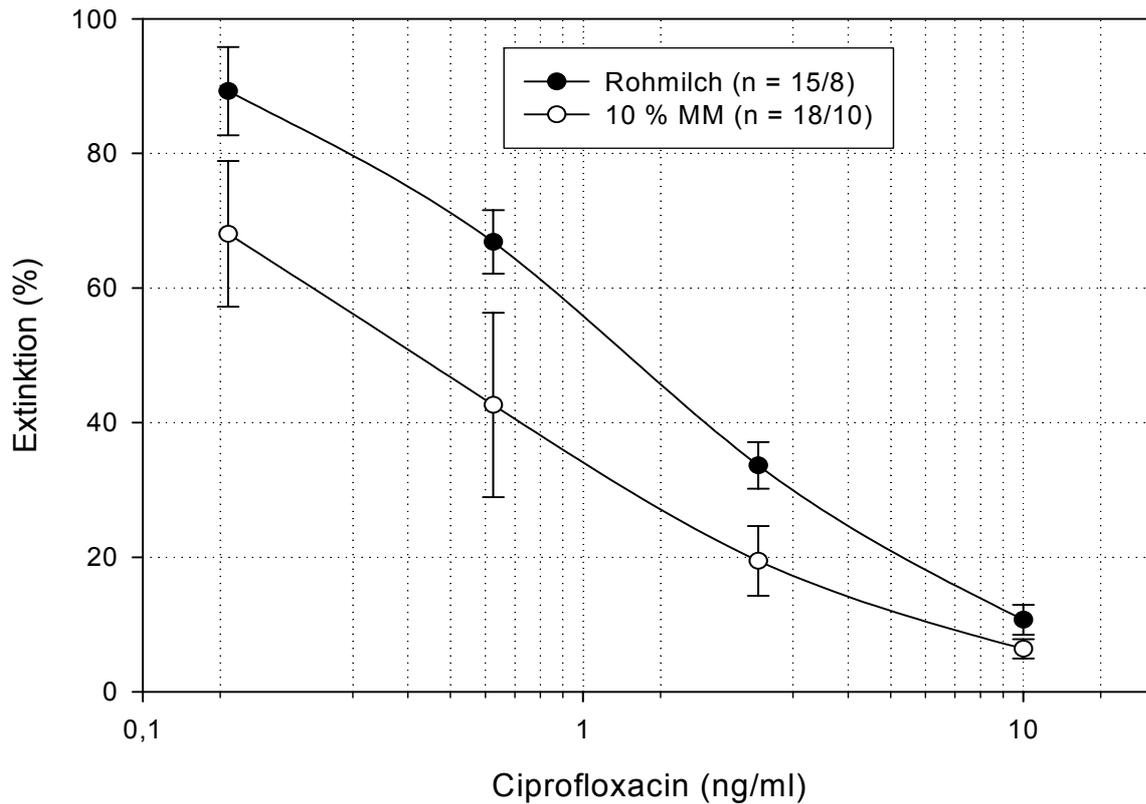
Die kommerziell bezogenen Platten wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb des aufgedruckten Verwendungszeitraumes benutzt. Die Tests wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die Auswertung erfolgte visuell. Proben, die in einzelnen oder allen Kavitäten erkennbar vom Farbton der Negativkontrollen abwichen, wurden erneut mit diesem Testverfahren untersucht. Bei erneut reduziertem Farbumschlag wurden die betreffenden Proben zur Absicherung und Quantifizierung des Ergebnisses in den in 3.2.2.5 beschriebenen EIA für den Nachweis von Penicillinen eingesetzt.

### **3.3. Ergebnisse der Untersuchungen von Milchproben sowie Auswertung wichtiger Testparameter**

Da die am Lehrstuhl entwickelten immunochemischen Testverfahren bereits im Rahmen früherer Arbeiten (siehe 3.1.4) anhand von künstlich kontaminierten Proben validiert worden waren, wurde auf die erneute Bestimmung von Wiederfindungsraten verzichtet. Die im Folgenden beschriebene Arbeit konzentrierte sich vielmehr auf die Untersuchung der Tank- und Konsummilchproben.

#### **3.3.1 Nachweis von Fluorchinolonen**

Wie in 3.1.4 bereits dargestellt, weist der verwendete Antikörper eine breite Spezifität auf, so dass mit dem EIA die ganze Gruppe der Fluorchinolone erfasst wird. Insgesamt wurden 420 Tankmilch- und 198 Konsummilchproben enzymimmunologisch auf Rückstände von Fluorchinolonen untersucht, zur Erstellung der Standardkurve wurde Ciprofloxacin verwendet. Der lineare Messbereich der Standardkurven umfasste den Bereich von 0,16 bis 10 ng/ml Milch. Die Nachweisgrenzen - definiert als die dem 70 %-Wert der Standardkurven entsprechende Antibiotikakonzentration - lagen für diejenigen Fluorchinolone, die bei Milchkühen eingesetzt werden dürfen, bei Berücksichtigung der relativen Kreuzreaktionen des mAk im Bereich von 0,1 (Enrofloxacin) bis 0,64 ng/ml (Flumequin). In Abb. 10 und Tab. 10 sind charakteristische Standardkurven und Kenndaten für dieses Nachweisverfahren dargestellt, wobei die in Rohmilch (Untersuchung von Tankmilchproben) bzw. in 10 % MM (Untersuchung von Konsummilchproben) angesetzten Standardkurven separat ausgewertet wurden.



**Abbildung 10:** *Typische Standardkurven für den Nachweis von Fluorchinolonen im simultan kompetitiven, direkten Enzymimmuntest. Die Standards wurden entweder in Rohmilch oder in rekonstituiertem Magermilchpulver (10 g auf 100 ml A. dest.) angelegt. Die bei der Auswertung der Standardkurven erhaltenen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Extinktionswerte des antigenfreien Kontrollansatzes lagen im Durchschnitt bei 1,28 (Rohmilch) bzw. 1,06 (10 % MM).*

*n = Anzahl der ausgewerteten Tests bzw. Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten EIAs*

**Table 10:** *Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Fluorchinolonen*

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50 %-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	0,5	0,3	1,3	0,5
Standardabweichung	0,14	0,12	0,25	0,29
Variationskoeffizient	28,6	41,4	19,5	58,1
Minimalwert	0,21	0,13	1,0	0,19
Maximalwert	0,84	0,5	1,9	1,2

a: Standards auf der Basis von Rohmilch (n = 15)

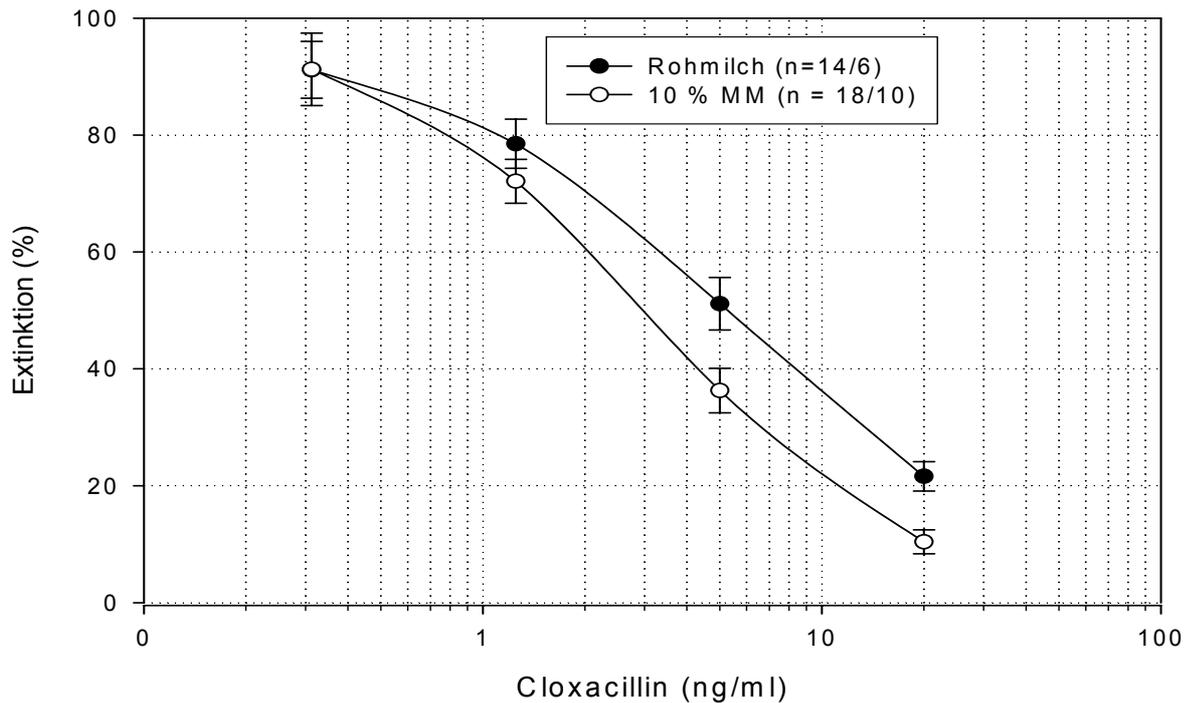
b: Standards auf der Basis von 10 % MM (n = 18)

Nach der ersten Testreihe waren 15 (3,57 %) Tankmilch- bzw. 30 (15,2 %) Konsummilchproben verdächtig, d. h. die Probe führte entweder zu einer relativen Hemmung des Substratumsatzes von  $\geq 20$  % oder der im EIA erhaltene Messwert lag 30 % unter der Probe mit der höchsten Extinktion. Fünf bzw. vier Proben zeigten eine hohe Streubreite der Einzelwerte (Variationskoeffizient  $> 10$  %) und wurden deshalb nochmals untersucht. Bei den Nachuntersuchungen konnten jedoch in keiner der Proben Rückstände von Fluorchinolonen nachgewiesen werden.

### 3.3.2. Nachweis von Cloxacillin

Aufgrund der in 3.1.4 skizzierten Kreuzreaktivität des mAk CloxaIIIF7 werden bei der enzymimmunologischen Untersuchung auf Cloxacillin alle veterinärmedizinisch zugelassenen

Isoxazolyl-Penicilline erfasst. Der lineare Messbereich der Standardkurven lag zwischen 1,0 ng/ml und 20 ng/ml Milch. Abb. 11 zeigt typische Standardkurven des enzymimmunologischen Nachweises von Cloxacillin und Tab. 11 fasst die wesentlichen Kenndaten des Testverfahrens zusammen.



**Abbildung 11:** Typische Standardkurven für den Nachweis von Cloxacillin im simultan kompetitiven, indirekten Enzymimmuntest. Die Standards wurden entweder in Rohmilch oder in rekonstituiertem Magermilchpulver (10 g auf 100 ml A. dest.) angelegt. Die bei der Auswertung der Standardkurven erhaltenen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Extinktionswerte des antigenfreien Kontrollansatzes lagen für beide Standardkurven im Durchschnitt bei jeweils 0,99.

*n* = Anzahl der ausgewerteten Tests bzw. Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten EIAs

**Tabelle 11:** Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Isoxazolyl-Penicillinen

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50 %-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	2,39	1,43	5,34	3,01
Standardabweichung	0,59	0,31	0,97	0,45
Variationskoeffizient	24,5	21,7	18,2	14,8
Minimalwert	1,37	0,95	3,6	2,3
Maximalwert	3,3	2,11	7,3	4,1

a: Standards auf der Basis von Rohmilch (n = 14)

b: Standards auf der Basis von 10 % MM (n = 18)

Von 23 (5,48 %) Tankmilch- und 12 (6,06 %) Konsummilchproben, die nach den in 3.3.1 aufgeführten Kriterien im Anschluss an die erste Testreihe nachuntersucht wurden, blieben letztlich zwei (0,48 %) Tankmilch- und eine (0,51 %) Konsummilchprobe übrig, bei denen ein Cloxacillin-Rückstand nicht ausgeschlossen werden konnte. Die relative Hemmung der Extinktion dieser Proben lag über alle Untersuchungsgänge hinweg bei mind. 30 %. Von diesen drei Proben wurden daraufhin jeweils 10 ml wie in 3.2.3 beschrieben über IAC gereinigt und die erhaltenen Eluate erneut im EIA überprüft. Unter den beschriebenen Bedingungen resultiert die IAC in einer Aufkonzentrierung des Analyten um etwa Faktor 10. Da es sich hierbei um ein bereits etabliertes Nachweisverfahren handelt (BEHMENBURG, 1999), wurde zur orientierenden Überprüfung des Verfahrens lediglich eine künstlich kontaminierte Milchprobe parallel zur untersuchten Konsummilchprobe eingesetzt. Hierbei lag die Wiederfindungsrate bei über 80 %. Zusätzlich diente auch die Untersuchung des Probendurchlaufs der Immunaффinitätschromatographie als Maßstab für die Funktionalität der

IAC-Säule. Sowohl im Durchlauf der Konsummilchprobe als auch in dem der kontaminierten Milchprobe konnten im EIA keine Antibiotika-Rückstände mehr festgestellt werden. Vielmehr konnten nach der IAC im Eluat der Konsummilchprobe Isoxazolympenicillin-Äquivalente entsprechend einer Konzentration von 2,34 ng/ml Milch (Tab. 12) nachgewiesen werden. Bei Berücksichtigung der relativen Kreuzreaktionen des verwendeten Cloxacillin-Antikörpers mit anderen Isoxazoly-Penicillinen (3.1.4) entsprächen dies Konzentrationen von 0,71 ng Dicloxacillin, 2,34 ng Cloxacillin bzw. 21,3 ng Oxacillin. Eine weitere analytische Differenzierung wurde aber nicht durchgeführt. Bei den beiden ebenfalls mittels IAC nachuntersuchten Tankmilchproben konnte hingegen der Verdacht eines Rückstandes im EIA nicht bestätigt werden.

**Tabelle 12:** *Extinktionswerte des Eluats der Isoxazolympenicillin-positiven Konsummilchprobe im EIA*

<b>Verdünnungs- stufe des Eluats</b>	<b>Extinktion (%)</b>	<b>Berechnete Konzentra- tion (ng/ml)</b>	<b>Verdünnungs- faktor zur Ausgangsprobe</b>	<b>Isoxazolyl-Penicillin- Konzentration in Ausgangsprobe (ng/ml)</b>
1:4	26,2	6,01	0,4	2,402
1:8	48,0	2,63	0,8	2,105
1:16	62,3	1,54	1,6	2,459
1:32	76,8	0,75	3,2	2,399

### **3.3.3 Nachweis von Aminoglykosidantibiotika**

Stellvertretend für die Gruppe der Aminoglykoside wurden sämtliche Proben auf Rückstände von Gentamicin, Neomycin und Streptomycin untersucht. Da bei allen drei Testsystemen die Standardkurven für die Untersuchung von Tankmilch- und Konsummilchproben nahezu deckungsgleich verlaufen, wurde auf eine vergleichende graphische Darstellung verzichtet. Die charakteristischen Kenndaten sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

### 3.3.3.1

### Nachweis von Gentamicin

Von allen im ersten Screening untersuchten Proben wurden 67 (16 %) Tankmilch- und 9 (4,55 %) Konsummilchproben in weiteren Testreihen nachuntersucht. Davon waren jedoch nur 24 Tankmilchproben aufgrund einer relativen Hemmung des Substratumsatzes (Definition siehe 3.3.1) verdächtig. Die übrigen Nachuntersuchungen waren aufgrund des strengen Maßstabs, der an die Streubreite der Einzelwerte gelegt worden war, nötig. Die größere Anzahl der nachuntersuchten Tankmilch- im Vergleich zu den Konsummilchproben ist darauf zurückzuführen, dass bei ersteren Proben nur Zweifach-Ansätze (3.2.2.1) im EIA untersucht wurden. Letztendlich konnte in keiner der Proben ein Rückstand von Gentamicin nachgewiesen werden. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient der durchgeführten EIA's lag im Durchschnitt bei 6,34 % bei der Untersuchung von Tank- bzw. 6,96 % bei der Untersuchung von Konsummilchproben.

**Tabelle 13:** *Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Gentamicin*

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50 %-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	6,9	6,76	16,0	14,9
Standardabweichung	1,95	1,29	5,94	3,02
Variationskoeffizient	28,3	19,1	37,0	20,4
Minimalwert	3,35	4,28	6,2	9,4
Maximalwert	10,5	9,01	27,1	19,6

a: Standards auf der Basis von Rohmilch (n = 14)

b: Standards auf der Basis von 10 % MM (n = 16)

**Table 14:** *Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Gentamicin (Erläuterung der Abkürzungen im Anschluss an die Tabelle)*

<b>Konz.</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>Extinktion</b> <b>(%)</b>	<b>s</b>	<b>VK</b> <b>(%)</b>	<b>Max.</b> <b>(%)</b>	<b>Min.</b> <b>(%)</b>
<b>Rohmilch</b>		n = 14	d = 14		
1000	5,95	2,63	44,3	14,0	3,3
100	18,1	3,96	21,9	25,8	11,6
10,0	57,9	8,13	14,0	70,6	40,4
1,0	97,1	5,58	6,12	100	81,5
<b>10 % MM</b>		n = 16	d = 9		
1000	3,13	0,69	22,2	4,5	1,9
100	14,2	1,44	10,2	17,2	11,2
10,0	58,1	4,86	8,37	66,3	48,9
1,0	91,7	6,26	6,83	100	82,8

Konz.: Antibiotikakonzentration der verwendeten Standardlösungen

s: Standardabweichung

VK: Variationskoeffizient

Max.: Maximalwert der relativen Extinktionen

Min.: Minimalwert der relativen Extinktionen

n: Anzahl der durchgeführten EIAs mit den angegebenen Konzentrationen

d: Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten EIAs

### 3.3.3.2 Nachweis von Neomycin

Von allen durchgeführten EIAs war das Testsystem zum Nachweis von Neomycin mit einem linearen Messbereich von 60 bis 1.500 ng/ml Milch mit Abstand das unempfindlichste, die Sensitivität des Testverfahrens lag trotzdem noch weit unter dem in der VO (EWG) 2377/90 festgelegten MRL von 1.500 ng/ml. Die Nachweisgrenze betrug 128 bzw. 98 ng/ml (Tab. 15). Bedingt durch die in 3.3.1 beschriebenen Kriterien an die relative Hemmung des Substratumsatzes wurden im ersten Untersuchungsgang 6 Tankmilch (1,43 %) und 17 (8,59 %) Konsummilchproben als verdächtig eingestuft. In weiteren Untersuchungen konnte bei keiner der Proben das Erstergebnis verifiziert werden. Entsprechend den Erläuterungen in 3.3.3.1 wurden daneben mehrere Proben aufgrund eines erhöhten Variationskoeffizienten nachuntersucht. Auch hierbei war bei keiner der Proben ein Rückstand nachweisbar.

**Table 15:** *Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Neomycin*

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50%-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	128	98,0	250	193
Standardabweichung	37,2	36,0	57,8	52,0
Variationskoeffizient	29,0	36,7	23,1	27,0
Minimalwert	57,4	40,6	117	107
Maximalwert	212	146	329	277

a: Standards auf der Basis von Rohmilch (n = 16)

b: Standards auf der Basis von 10 % MM (n = 15)

**Tabelle 16:** Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Neomycin (Erläuterung der Abkürzungen siehe Tab. 14)

<b>Konz. (ng/ml)</b>	<b>Extinktion (%)</b>	<b>s</b>	<b>VK (%)</b>	<b>Max. (%)</b>	<b>Min. (%)</b>
<b>Rohmilch</b>		n = 16	d = 16		
1500	12,9	2,58	20,0	17,7	8,1
300	44,5	7,09	15,9	52,7	24,2
60	81,6	6,86	8,4	100	68,8
12	96,1	4,83	5,02	109	89,6
<b>10 % MM</b>		n = 15	d = 9		
1500	10,5	1,99	19,1	13,8	6,9
300	39,5	4,89	12,4	48,1	31,2
60	76,2	8,66	11,4	86,4	58,2
12	90,2	7,15	7,93	100	76,6

### 3.3.3.3 Nachweis von Streptomycin

In einem ersten Untersuchungsgang wurden 618 Proben auf Rückstände von Streptomycin untersucht. Davon wurden 12 (2,86 %) Rohmilch- und 3 (1,52 %) Konsummilchproben aufgrund einer relativen Hemmung des Substratumsatzes nachuntersucht. Die relative Hemmung im Vergleich zum antigenfreien Kontrollansatz bewegte sich bei diesen Proben zwischen 9 und 43 %. Zusätzlich wurden noch weitere 26 Tankmilchproben, die bedingt durch den Zweifach-Ansatz erhöhte Streuungen bei den Messwerten aufwiesen, nachuntersucht, ohne dass bei einer der Proben ein Rückstand festgestellt werden konnte. Bei den durchgeführten EIAs lagen die Extinktionswerte des antigenfreien Kontrollansatzes im Durchschnitt bei 1,05 (Rohmilch) bzw. 1,03 (10 % MM), die Intra-Assay-Variationskoeffizienten lagen bei 6,23 % (Rohmilch) bzw. 7,0 % (10 % MM). Weitere charakteristische Kenndaten sind den Tab. 17 und 18 zu entnehmen. Die Nachweisgrenzen für Streptomycin lagen bei 7,4 bzw. 6,3 ng/ml, daraus ergeben sich bei Berücksichtigung der

relativen Kreuzreaktion des mAk Nachweisgrenzen für Dihydrostreptomycin von 9,71 ng/ml bei der Untersuchung von Tank- bzw. 8,24 ng/ml bei der Untersuchung von Konsummilchproben.

**Tabelle 17:** *Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Streptomycin*

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50 %-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	7,4	6,28	17,0	14,0
Standardabweichung	3,41	0,98	7,37	2,51
Variationskoeffizient	46,0	15,6	43,2	17,9
Minimalwert	3,9	4,31	10,4	10,7
Maximalwert	16,3	8,17	34,2	19,3

a: Standards auf der Basis von Rohmilch (n = 14)

b: Standards auf der Basis von 10 % MM (n = 16)

**Tabelle 18:** Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Streptomycin (Erläuterung der Abkürzungen siehe Tab. 14)

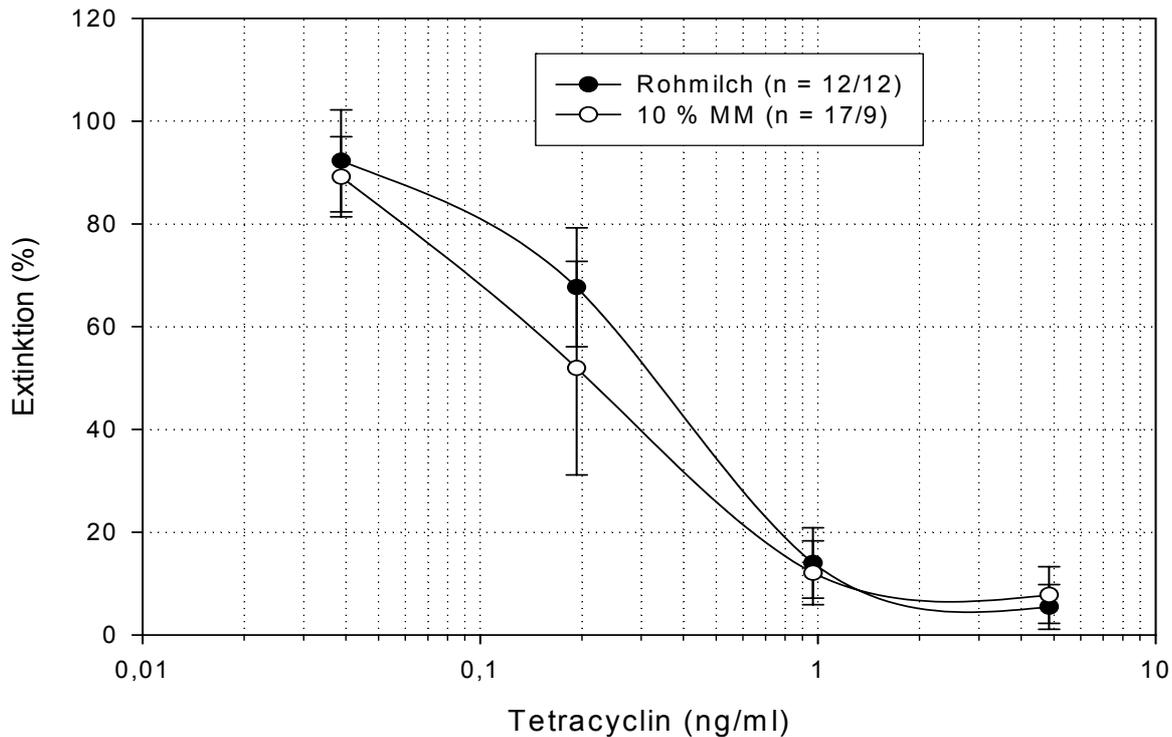
<b>Konz.</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>Extinktion</b> <b>(%)</b>	<b>s</b>	<b>VK</b> <b>(%)</b>	<b>Max.</b> <b>(%)</b>	<b>Min.</b> <b>(%)</b>
<b>Tankmilch</b>		n = 14	d = 14		
200	14,5	8,89	61,2	42,2	6,6
40,0	31,3	7,36	23,5	47,5	23,9
8,0	64,7	7,82	12,1	80,2	55,2
1,6	88,8	7,24	8,16	100	78,3
<b>Konsummilch</b>		n = 16	d = 9		
200	8,36	1,34	16,0	10,7	5,4
40	27,8	2,87	10,3	33,0	23,4
8	62,5	4,26	8,82	70,3	56,2
1,6	90,2	5,73	6,36	100	78,2

### 3.3.4 Nachweis von Tetracyclinen

Mittels des in 3.2.2.3 beschriebenen indirekten EIA's wurden 420 Tankmilch- und 198 Konsummilchproben auf Rückstände von Tetracyclinen untersucht. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, war es notwendig, sowohl die hergestellten Standards als auch die Milchproben vor dem Einsetzen in den EIA im Verhältnis 1:30 in PBS zu verdünnen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie der relativen Kreuzreaktion zu Chlortetracyclin ergeben sich Nachweisgrenzen von 6 (Tetracyclin) bzw. 6,9 ng/ml (Chlortetracyclin) in Rohmilch, sowie 4,2 bzw. 4,83 ng/ml in 10 % MM.

Im ersten Untersuchungsgang waren 29 (6,9 %) Tankmilch- und 11 (5,56 %) Konsummilchproben aufgrund erniedrigter Extinktionswerte auffällig. Diese wiesen im Vergleich zum antigenfreien Kontrollansatz eine relative Hemmung von 7 – 65 % auf. Sowohl bei diesen, als auch bei den Proben, die aufgrund hoher Variationskoeffizienten

nachuntersucht wurden, konnten in weiteren Tests jedoch keine Rückstände an Tetracyclinen festgestellt werden. Eine Auswertung von 29 Einzeltests führte zu den in Abb. 12 dargestellten Standardkurven, sowie den in Tab. 19 aufgeführten Durchschnittswerten für die Nachweisgrenze und den 50 %-Wert.



**Abbildung 12:** Typische Standardkurven für den Nachweis von Tetracyclinen im simultan kompetitiven, indirekten Enzymimmuntest. Die Standards wurden entweder in Rohmilch oder in rekonstituiertem Magermilchpulver (10 g auf 100 ml A. dest.) angelegt. Die bei der Auswertung der Standardkurven erhaltenen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Extinktionswerte des antigenfreien Kontrollansatzes lagen im Durchschnitt bei 0,92 (Rohmilch) bzw. 0,96 (10 % MM).

*n = Anzahl der ausgewerteten Tests bzw. Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten EIAs*

**Tabelle 19:** Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Tetracyclinen. Die Standardkurven wurden in jeweils 1:30 verdünnter Rohmilch (a; n = 12) bzw. 10 % MM (b; n = 17) angelegt.

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50 %-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	0,2	0,14	0,32	0,24
Standardabweichung	0,07	0,06	0,09	0,11
Variationskoeffizient	34,6	45,2	27,5	45,0
Minimalwert	0,13	0,04	0,09	0,07
Maximalwert	0,29	0,24	0,45	0,4

### 3.3.5 Nachweis von Sulfadiazin

Um den Verlauf der Standardkurve zu optimieren, wurden im Laufe der Untersuchungen von Tankmilchproben die Konzentrationen der eingesetzten Standardlösungen mehrfach verändert. Deswegen konnte für die in Tab. 20 und 21 zusammengefassten Auswertungen nur eine vergleichsweise geringe Anzahl an Tests berücksichtigt werden. Die letztendlich erhaltene charakteristische Standardkurve verläuft nahezu identisch mit der Kurve der Konsummilchuntersuchungen, dabei lag der lineare Messbereich etwa zwischen 0,46 ng/ml und 25 ng/ml Milch. Eine graphische Darstellung ist Abb. 13 (siehe S. 80) zu entnehmen

Von der Gesamtzahl der Proben wiesen 32 (7,62 %) Tankmilch- und 30 (15,2 %) Konsummilchproben im ersten Test ein nach den in 3.3.1 erläuterten Maßstäben auffälliges Ergebnis auf. Bei vier dieser Rohmilch- und 25 der Konsummilchproben konnte auch in darauffolgenden Tests ein Rückstand an Sulfadiazin nicht ausgeschlossen werden. Diese vier

Rohmilchproben und vier stichprobenartig aus den 25 verdächtigen Konsummilchproben ausgewählten Proben wurden daraufhin, wie in 3.2.3 beschrieben, mittels Immunaффinitätschromatographie konzentriert. Orientierende Versuche zur Funktionalität der verwendeten IAC-Säulen bestätigten, dass unter den in 3.2.3 beschriebenen Bedingungen bei künstlich kontaminierten Milchproben mit einer Ausgangskonzentration von 5 ng/ml Wiederfindungsraten von über 75 % erzielt werden können. Bei der Untersuchung der Eluate der verdächtigen Proben mittels EIA konnte jedoch in keinem Eluat Spuren von Sulfadiazin nachgewiesen werden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die parallel untersuchten Probendurchläufe auch nach der IAC noch eine unspezifische Hemmung im EIA verursachen. Weitere Versuche zur Identifizierung der mit dem EIA interferierenden Substanzen wurden nicht durchgeführt.

**Tabelle 20:** *Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Sulfadiazin*

	Nachweisgrenze (ng/ml)		50 %-Wert (ng/ml)	
	a	b	a	b
Mittelwert	1,51	1,54	3,45	3,6
Standardabweichung	0,48	0,52	1,18	1,21
Variationskoeffizient	31,8	33,6	34,1	33,5
Minimalwert	1,0	0,81	2,4	2,3
Maximalwert	2,24	2,75	5,3	6,8

a: Standards auf der Basis von Rohmilch (n = 6)

b: Standards auf der Basis von 10 % MM (n = 18)

**Tabelle 21:** Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Sulfadiazin (Erläuterung der Abkürzungen siehe Tab. 14)

<b>Konz.</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>Extinktion</b> <b>(%)</b>	<b>s</b>	<b>VK</b> <b>(%)</b>	<b>Max.</b> <b>(%)</b>	<b>Min.</b> <b>(%)</b>
<b>Tankmilch</b>		n = 6	d = 6		
100	5,6	1,66	29,6	7,9	2,7
16,7	21,8	3,3	15,2	26,1	17,0
2,78	53,5	6,8	12,7	64,4	46,8
0,46	83,5	5,4	6,44	89,8	76,3
<b>Konsummilch</b>		n = 18	d = 8		
100	6,7	1,3	20,3	9,0	3,6
16,7	22,8	4,3	18,6	31,7	16,4
2,78	54,4	6,6	12,1	69,7	46,6
0,46	84,0	6,5	7,7	97,8	74,6

### 3.3.6 Auswertung des BRT-Verfahrens

In der Zeit vom September 2005 bis November 2006 wurden mit 24 BRT-Platten des Typs „MRL-Suchtest“ 420 Rohmilch- und 198 Konsummilchproben auf Rückstände von Antiinfektiva untersucht. Zusammen mit dem Probenmaterial wurden auch künstlich kontaminierte Milchproben mit Konzentrationen von 4, 3, 2 und 1 ng Penicillin G pro ml Milch und Negativkontrollen in jeden Test eingesetzt. Die Negativkontrolle bestand dabei je nach Art der zu untersuchenden Milchprobe aus hemmstofffreier Rohmilch oder Konsummilch. Die Auswertung der Tests erfolgte visuell durch den Vergleich des Farbtons der Kavitäten mit Probenmaterial und der gelben Farbstufe der Negativkontrollen. Proben, die auffällig vom Farbton der Negativkontrollen abwichen, wurden erneut in einen BRT eingesetzt. Dies war bei zwei (1,01 %) Konsummilch- und sieben (1,67 %) Tankmilchproben der Fall. Bei einer Konsummilch- und zwei Tankmilchproben konnte auf diese Weise trotz

wiederholter Untersuchungen ein Hemmstoff-Rückstand nicht ausgeschlossen werden. Diese Proben wurden daraufhin in einen etablierten EIA-Test, der den semiquantitativen Nachweis von Penicillinen erlaubt (STRASSER et. al., 2003; siehe 3.1.4), eingesetzt. Der lineare Messbereich der Standardkurven lag zwischen 0,39 ng/ml und 100 ng/ml Milch. Dabei konnten bei den beiden Tankmilchproben Rückstände in Konzentrationen von 1,17 ng bzw. 1,23 ng Penicillin-Äquivalenten pro ml Milch nachgewiesen werden. Der Verdacht auf Penicillin-Rückstände bei der Konsummilchprobe bestätigte sich nicht.

## **4 Diskussion**

Bei Milchkühen werden Antibiotika und Sulfonamide vor allem zur Therapie von Euterentzündungen eingesetzt und sind aus der tierärztlichen Praxis zum heutigen Zeitpunkt nicht wegzudenken. So wurden in einem Feldversuch bei subklinischen Mastitiden mit antibiotischen Behandlungsmethoden eindeutig bessere Heilungsraten als bei homöopathisch therapierten Rindern erzielt (WALKENHORST, 2006). Den Großteil der dabei verwendeten Stoffe mit antimikrobieller Wirkung stellt die Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dar, die dementsprechend häufig (> 90 %) als Verursacher hemmstoffpositiver Befunde identifiziert wird (MILCHPRÜFRING BAYERN E.V., 2002; KRESS et al., 2007). Wie eine neuere Umfrage unter bayerischen Tierärzten zeigte, nimmt aber der Anteil anderer Wirkstoffgruppen in der Rinderpraxis immer mehr zu (LAUEN, 2006). Ein Teil dieser Wirkstoffe wird mit dem BRT-Test, der bei den im Rahmen der Milchgüte-VO durchgeführten Untersuchungen routinemäßig verwendet wird, nur unzureichend erfasst (SUHREN, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen insbesondere überprüft, ob und inwieweit in bayerischen Roh- und Konsummilchen Spuren von antimikrobiell wirksamen Rückständen zu finden sind, die mit herkömmlichen Methoden nicht nachweisbar sind. Da es derzeit mit vertretbarem Aufwand nicht möglich ist, den Probenpool auf alle für die Behandlung von Rindern, die der Milcherzeugung dienen, zugelassenen Wirkstoffe [VO (EWG) Nr. 2377/90] zu untersuchen, konzentrierten sich die Arbeiten auf ausgewählte Antiinfektiva. Wesentliche Aspekte bei der Auswahl der Analyten waren die Häufigkeit des Arzneimitteleinsatzes (LAUEN, 2006) und die Verfügbarkeit von hochsensitiven Nachweisverfahren (3.2.2), wobei hier aus Gründen des angestrebten Probendurchsatzes immunchemische Verfahren im Vordergrund standen.

### **4.1 Charakteristika der Analyseverfahren**

Da im Rahmen der Arbeit sowohl unbehandelte Rohmilch (Tankmilch) als auch wärmebehandelte, homogenisierte Konsummilch mit den Testverfahren untersucht werden sollte, mussten die größtenteils bereits in früheren Studien etablierten EIA-Systeme mittels Schachbretttitration optimiert und an die jeweiligen Probenmatrices angepasst werden. Um die Beeinflussung des EIA-Systems möglichst gering zu halten, wurden die Standards in

einem Probenmatrix-assistierte Ansatz je nach Untersuchungsmaterial in Rohmilch bzw. in 10% MM verdünnt. Dies führte dazu, dass nach Optimierung der EIA's bei einigen Testverfahren - insbesondere beim Fluorchinolon- und mit Abstrichen beim Cloxacillin-Nachweis - die Konzentration der eingesetzten Reagenzien relativ stark schwankte (3.3.2). Als Folge davon wurde bei diesen beiden EIA auch ein relativ deutlicher Unterschied im Kurvenverlauf der in Rohmilch bzw. 10 % MM angesetzten Standardkurven beobachtet, die entsprechenden Testmittelpunkte lagen bei 1,3 bzw. 0,5 ng/ml (Fluorchinolon-EIA) und bei 5,3 bzw. 3,1 ng/ml (Cloxacillin-EIA). Dieser Effekt war unabhängig vom verwendeten EIA-Typ und trat bei direkten (Fluorchinolon-EIA) und indirekten (Cloxacillin-EIA) Systemen gleichermaßen auf. Zurückzuführen könnte dies auf eine gewisse „Fettintoleranz“ der Immunreagenzien in diesen Nachweisverfahren sein, da prinzipiell bei den Rohmilchansätzen höhere Konzentrationen v.a. der markierten Antigene eingesetzt werden mussten. Die Beeinflussung von EIA-Verfahren durch die Probenmatrix "Milch" wurde bereits von MÄRTLBAUER (1993) detailliert beschrieben.

Beim Vergleich der Testmittelpunkte der auf die Probenmatrix Rohmilch optimierten EIA's mit denen in 10 % MM erhaltenen Daten fällt auf, dass tendenziell bei letzteren etwas bessere Sensitivitäten erreicht wurden. Auch im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Verfahren wurden z. T. ausgeprägte Unterschiede ermittelt, allerdings ließ sich hierbei keine einheitliche Tendenz feststellen. So führte der höhere Fettgehalt bei den Untersuchungen mit Standardlösungen auf der Basis von Rohmilch im indirekten Streptomycin-EIA zu signifikant höheren Variationskoeffizienten (43,2 % für den 50 %- bzw. 46,0 % für den 70 %-Wert) als bei denjenigen mit Magermilch-Standards (17,9 % bzw. 15,6 %). Ähnliches gilt für den Gentamycin-Nachweis (indirekter EIA), während beim ebenfalls indirekten EIA zum Nachweis von Tetracyclinen die in 10 % MM angesetzten Standardkurven deutlich höhere Schwankungen aufwiesen.

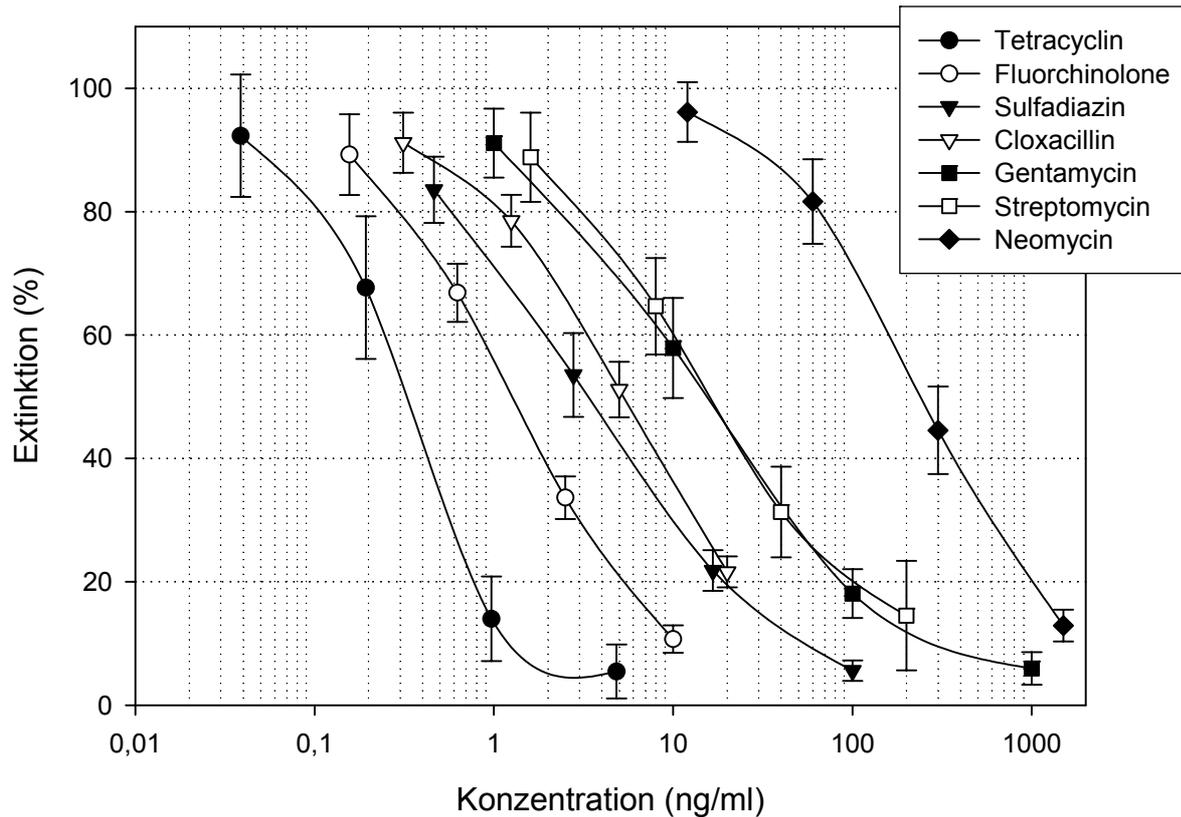
Prinzipiell zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeiten ermittelten Daten zur Reproduzierbarkeit der EIA-Verfahren (3.2.2.1 – 3.2.2.5) eine etwas höhere Schwankungsbreite als bei vergleichbaren Studien (LOCHBIHLER, 1994; STRASSER, 2003), wobei zwischen den verschiedenen EIA-Systemen (direkt, indirekt) keine eindeutigen Unterschiede zu beobachten waren. Die Inter-Assay-Variationskoeffizienten der Testmittelpunkte bewegten sich über alle EIA-Verfahren hinweg im Bereich von 14,8 bis 58,1 %, wobei beim Großteil

der immunchemischen Verfahren zum Nachweis von Antiinfektiva EIA-typische Werte (MÄRTLBAUER, 1993) von 20 -30 % erhalten wurden. Beim Cloxacillin-Nachweis beliefen sich die Variationskoeffizienten bei den Magermilch-Standards auf 14,8 % für den 50 %- bzw. 21,7 % für den 70 %-Wert und lagen damit im gleichen Bereich, wie von BEHMENBURG (1999) für Standardlösungen auf PBS-Basis beschrieben. Die bei einigen Tests beobachteten, etwas geringeren Reproduzierbarkeiten bei der Rohmilch-Untersuchung wurden in Kauf genommen, da so auf das umständliche Entfetten der Proben verzichtet werden konnte.

Um einen Eindruck von der Bandbreite der Testsensitivitäten der sieben verwendeten EIA-Verfahren zu vermitteln, sind in Abb. 13 die typischen Standardkurven der Nachweise vergleichend dargestellt. Für den Nachweis von Antiinfektiva in Konsummilch bewegten sich die Nachweisgrenzen im Bereich von 0,3 µg Ciprofloxacin bis 98 µg Neomycin pro kg Milch. Bei Berücksichtigung der Kreuzreaktivität des gegen Fluorchinolone gerichteten mAk's lag die niedrigste nachweisbare Antibiotika-Rückstandskonzentration noch niedriger, nämlich bei 0,1 µg Enrofloxacin pro kg Milch. Beim ebenfalls hochsensitiven Tetracyclin-Nachweis (Abb. 13) mussten allerdings die Proben im Verhältnis 1:30 verdünnt werden, um Probenmatrixeffekte auszuschließen. Das unempfindlichste Verfahren stellte der Neomycin-Nachweis dar, obwohl der eingesetzte mAk laut Herstellerangaben (ACRIS ANTIBODIES GmbH, 2007) zumindest in Pufferlösungen eine hohe Affinität aufweist. Da die Nachweisgrenzen von 98 bzw. 128 µg/kg Milch aber immer noch um ca. Faktor 15 unter dem derzeit gültigen MRL liegen und die Anzahl der Präparate mit diesem Wirkstoff überschaubar ist (EUROVET, 2007), wurden keine weiteren Anstrengungen zur Optimierung des Verfahrens unternommen. Von DIANA et al. (2007) validierte EIAs erwiesen sich im Vergleich der 50 %-Werte sogar als noch unempfindlicher: 334 µg/kg bei Neomycin bzw. 64,2 µg/kg bei Gentamicin. Sowohl für den Nachweis von Gentamicin als auch von Neomycin wurden zwischenzeitlich aber auch schon wesentlich sensitivere Testsysteme mit Nachweisgrenzen bis in den pg-Bereich beschrieben (JIN et al., 2005 und 2006b; CHEN et al., 2007).

Für alle anderen EIAs, die auf am Lehrstuhl entwickelten Antikörpern basieren, gilt, dass die etablierten Testverfahren zu den empfindlichsten, bislang beschriebenen Nachweismethoden zählen (siehe 2.3.2, Tab. 5). Dies wird insbesondere deutlich beim in Tab. 22 dargestellten

Vergleich der Testsensitivitäten mit den derzeit gültigen MRL-Werten. Grundsätzlich liegt die Empfindlichkeit der EIA-Tests mindestens um Faktor 10 unter den MRL-Werten, beim Enrofloxacin sogar um mehrere Größenordnungen (Nachweisgrenze 0,1 µg/kg; MRL 100 µg/kg).



**Abbildung 13:** Standardkurven der verwendeten EIA-Testsysteme zum Nachweis von Antiinfektiva in Tankmilch

**Table 22:** *Vergleich zwischen den Nachweisgrenzen der durchgeführten EIAs (Rohmilch) und den MRL-Werten des jeweiligen Analyts*

<b>Analyt</b>	<b>Nachweisgrenze<sup>1</sup> (µg/kg)</b>	<b>MRL (µg/kg)</b>
Ciprofloxacin	0,5	100
Cloxacillin	2,39	30
Gentamicin	6,9	100
Neomycin	128	1.500
Streptomycin	7,4	200
Sulfadiazin	1,51	100
Tetracyclin	6,0	100

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit hochempfindliche Screeningmethoden zum Nachweis von Antiinfektiva optimiert und an die Probenmatrix "nicht entfettete" Rohmilch bzw. Konsummilch adaptiert wurden. Die Reproduzierbarkeit der Verfahren wurde dokumentiert. Da es nicht Ziel der im Folgenden diskutierten Untersuchungen war, eine Überwachung der Proben auf MRL-Niveau zu gewährleisten, wurde auf eine weitergehende Validierung der Analyseverfahren entsprechend Entscheidung 2002/657/EG verzichtet.

## **4.2 Befunde der Rückstandsuntersuchungen**

Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass bedingt durch das Design der Studie z. T. ein relativ hoher Anteil der Proben nachuntersucht werden musste. Die entsprechenden Prozentsätze lagen je nach Nachweisverfahren bei den Tankmilchproben im Bereich von 1,4 bis 7,6 %, bei den Konsummilchproben bei 1,2 bis 15,2 %; im Mittel lag die Rate für die Nachuntersuchungen bei 7,2 %, wobei zwischen Tank- und Konsummilchproben keine offensichtlichen Unterschiede beobachtet werden konnten. Höhere Raten traten v. a. bei den

beiden direkten EIA-Formaten (Fluorchinolon- und Sulfadiazin-Nachweis) auf, wobei beim Sulfadiazin-Testsystem bei einer ganzen Reihe von Proben (0,95 % der Rohmilch- bzw. 12,6 % der Konsummilchproben) auch durch Nachuntersuchungen das Vorliegen von Rückständen nicht ausgeschlossen werden konnte. Ähnliches wurde von LOCHBIHLER (1994) bei Untersuchungen mit demselben Testsystem beobachtet, wobei in diesen früheren Untersuchungen die Milch allerdings 1:4 verdünnt in den EIA eingesetzt wurde. Im Durchschnitt reagierten 4 % der Proben schwach positiv (ebenfalls mehr Konsummilch- als Rohmilchproben) ohne durch weiterführende Verfahren letztendlich Rückstände nachweisen zu können. Analog zur weiteren Vorgehensweise in der erwähnten Studie wurden auch in der vorliegenden Arbeit mehrere stichprobenartig ausgewählte verdächtige Proben mittels Immunaффinitätschromatographie gereinigt und in den EIA eingesetzt, ohne dass die positiven Ergebnisse des Screenings bestätigt werden konnten. Diese testspezifische Tendenz, falsch-positive Ergebnisse zu produzieren, beschränkt sich allerdings auf den spurenanalytischen Bereich und äußert sich durch eine relative Hemmung des Substratumsatzes im EIA von maximal 40 %. Dies entspricht Werten von etwa 5 – 7 µg/kg und liegt damit weit unter dem MRL von 100 µg/kg.

Drei im mikrobiologischen Screening (BRT-Test) auffällige Proben wurden mittels Penicillin G – EIA's nachuntersucht. Bei einer der Proben handelte es sich um eine von insgesamt drei untersuchten Ziegen-H-Konsummilchproben. Während bei zwei dieser Ziegenmilch-Proben keine Auffälligkeiten festgestellt werden konnten, wurde bei einer Probe im BRT-Test kein vollständiger Farbumschlag beobachtet. Dies steht im Einklang mit einer Studie von SCHULZE (2002), wonach Ziegenmilchproben im MRL-Suchtest eine z. T. erheblich längere Inkubationszeit benötigen. Im EIA konnte dann folgerichtig auch keine Anwesenheit von Hemmstoffen nachgewiesen werden. Für zwei Tankmilchproben bestätigte sich im EIA jedoch das positive Ergebnis der mikrobiologischen Tests.

Ziel der Untersuchung der Tankmilchproben (n = 420) auf Rückstände von Antiinfektiva war es, festzustellen, ob und wie häufig mittels hochempfindlicher enzymimmunologischer Verfahren Rückstände von Antiinfektiva nachgewiesen werden können. Durch die Untersuchung der Tankmilch konnte indirekt ein breites Spektrum an landwirtschaftlichen Betrieben abgedeckt werden, insbesondere auch, weil im oberbayerischen Einzugsgebiet der Molkerei, die die Tankmilchproben zur Verfügung gestellt hat, noch eine eher kleinbäuerliche

landwirtschaftliche Struktur vorherrschend ist, so dass in einem Tankwagen Milch von z. T. deutlich mehr als 50 verschiedenen Lieferanten gesammelt wird. Des Weiteren sind auf der Tankmilch-Sammelebene eventuell rückstandpositive Einzelgemelke noch nicht so weit verdünnt, dass die Wirkstoffe nicht mehr nachzuweisen wären. Aus den Parametern "Einzelgemelksgrößen von 30 l/d" und "Fassungsvermögen des Tankwagens von ca. 15.000 l" resultiert theoretisch eine Verdünnung von 1:500, d. h. Milchlieferungen behandelter Tiere innerhalb der Wartezeit könnten bei allen untersuchten Analyten problemlos detektiert werden. Bei den Untersuchungen konnten trotzdem letztendlich nur bei zwei Tankmilchproben Rückstände unterhalb der gesetzlichen Höchstmenge von 1,17 bzw. 1,25 µg/kg eines Penicillins festgestellt werden. Aufgrund der oben diskutierten Struktur der Anlieferungsbetriebe ist davon auszugehen, dass die kontaminierte Anlieferungsmilch mit Rückstandskonzentrationen von deutlich über dem MRL-Wert belastet war.

Das Ergebnis der Tankmilchuntersuchung deckt sich mit Erfahrungen der letzten Jahre bei flächendeckenden Untersuchungen in Deutschland, wonach sowohl Tank- und Anlieferungsmilch nur zu einem geringen Prozentsatz rückstandsbelastet sind (BVL, 2001 und 2006; MILCHPRÜFRING BAYERN E.V., 2005 und 2006). LOCHBIHLER (1994) konnten in ähnlichen Untersuchungen ebenfalls auf Tankwagenebene weder Spuren von (Dihydro)Streptomycin noch von Tetracyclinen bzw. Sulfonamiden feststellen. Bei Untersuchungen in so genannten Entwicklungsländern werden hingegen teilweise Rückstandsbelastungen im zweistelligen Prozentbereich gefunden (BAYNES et al., 1999; SHITANDI und STERNESJÖ, 2001 und 2004, BONFOH et al., 2003; KANG'ETHE et al., 2005), was wohl auf die mangelnden Qualitätsstandards vor Ort zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können dahingehend interpretiert werden, dass die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika offensichtlich immer noch zu den am häufigsten in der Therapie von Mastitiden eingesetzten Antiinfektiva gehören (LAUEN, 2006) und deswegen auch für den Großteil der Antibiotika-Rückstände in der Milch verantwortlich sind (KRESS et al., 2007). Auch bei Untersuchungen von SUHREN (2002) waren  $\beta$ -Lactam-Antibiotika für den weitaus überwiegenden Teil der hemmstoffpositiven Ergebnisse verantwortlich, wobei in dieser Studie auch bereits auf die zunehmende Bedeutung der Cephalosporine hingewiesen wurde. Dies wurde auch in neueren Arbeiten aus dem In- und Ausland bestätigt (SAWANT et al., 2005; KRESS et al. 2007). Zu Beginn der eigenen Untersuchungen stand jedoch kein

einfaches spezifisches Screening-Verfahren mit ausreichend hoher Sensitivität für Wirkstoffe dieser Antibiotika-Gruppe zur Verfügung, so dass auch im Hinblick auf den vertretbaren Aufwand keine spurenanalytischen Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Allerdings ist der für die Untersuchungen eingesetzte mikrobiologische Hemmstofftest laut Herstellerangaben (AIM, 2005) durchaus in der Lage, höhere Konzentrationen von Cephalosporinen in den Proben zu detektieren. Entsprechende Befunde wurden allerdings nicht erhalten.

Eine Fragestellung, die durch die Untersuchung von Konsummilchproben (n = 198) beantwortet werden sollte, war, ob es Hinweise darauf gibt, dass Hemmstoff-positive Tankmilch weiterverarbeitet wird. Wie eingangs erwähnt, sind ähnliche Praktiken bei einer britischen Molkerei bekannt geworden. In der vorliegenden Arbeit konnten nur bei einer Konsummilchprobe Rückstandsspuren nachgewiesen werden. Der Befund wurde mittels IAC bestätigt, die nachweisbaren Konzentrationen an Isoxazolylpenicillin-Äquivalenten lagen bei 2,34 µg/kg. Bei Molkereien ist es mittlerweile im Rahmen der Qualitätssicherung üblich, Anlieferungsmilch bei der Eingangskontrolle mittels kommerzieller Schnelltests (CHARM, Snap etc.; Übersicht bei QUANDT, 2006) auf β-Lactam-Rückstände zu untersuchen. Mit diesen Tests können auch Isoxazolyl-Penicilline im Bereich des MRL nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass mittels der Schnelltests eine Arzneimittelbelastung nachweisbar war, hätte die verarbeitete Tankmilch demnach Rückstände von mindestens 30 µg Isoxazolyl-Penicilline per kg enthalten. Um in der letztendlich abgefüllten Konsummilch eine Konzentration von 2,34 µg/kg zu erhalten, müsste die Milch des betroffenen Tankwagens etwa mit der 13-fachen Menge unbelasteter Milch vermischt worden sein. Auch wenn dies bei einer Tagesproduktion von 300.000 l Konsummilch vorstellbar wäre, ist es auch im Hinblick auf den Produktionsablauf (Zwischenlagerung der angelieferten Tankmilch in Stapeltanks mit einem Fassungsvermögen von mehreren 10.000 Litern) wahrscheinlicher, dass in diesem Fall die Kontamination der Tankmilch unter der Nachweisgrenze des verwendeten Schnelltests lag. Unter Berücksichtigung des bei der Sammelkette – Betriebsmilch, Tankwagenmilch, Werkmilch – auftretenden Verdünnungseffektes ist es jedoch unstrittig, dass eine der gesammelten Betriebsmilchen massiv mit Isoxazolyl-Penicillinen kontaminiert gewesen sein muss. Durch den Einsatz von Biosensoren, mit denen die Milch bereits bei der Abholung auf Rückstände getestet werden kann, könnte bereits frühzeitig verhindert werden, dass kontaminierte Milch zu Konsummilch verarbeitet wird. Entsprechende Forschungen waren

und sind Gegenstand verschiedener am Lehrstuhl bearbeiteter Projekte (STRASSER, 2003; KNECHT et al., 2004).

Obwohl der Nachweis der Rückstandsfreiheit von Konsummilch gerade für den Verbraucher von unmittelbarer Bedeutung ist, konzentrieren sich die meisten Studien auf die Untersuchung von Rohmilchproben, da dabei die Wahrscheinlichkeit eines hemmstoffpositiven Befundes größer ist. In einer der wenigen Veröffentlichungen zur Belastung von Konsummilch konnte von LOCHBIHLER (1994) in einer bayernweiten Monitoring-Studie keine Rückstände von Antiinfektiva in Konsummilch nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden SCHÜTTEL et al. (2000) bei einer Untersuchung von Konsummilchproben in Nordrhein-Westfalen bei einem vergleichsweise hohem Prozentsatz der Proben Rückstände von Sulfonamiden, wobei allerdings keine Angaben zum verwendeten Nachweisverfahren gemacht wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nur in sehr seltenen Ausnahmefällen Konsummilch mit Spuren von Antibiotika-Rückständen belastet ist – ein Zeichen für das funktionierende Qualitätsmanagement bei den produzierenden Molkereien. Auch auf Tankmilchebene konnten mit Ausnahme von zwei gering mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kontaminierten Proben keine Hinweise auf eine nennenswerte Rückstandsproblematik erhalten werden. Im Hinblick auf die in jüngerer Zeit stark beworbenen Cephalosporine mit keiner oder sehr kurzer Wartezeit wären weitere Untersuchungen, die sich auf diese Wirkstoffgruppe konzentrieren, wünschenswert.

## 5 Zusammenfassung

In den Jahren 2006 bis 2007 wurden insgesamt 618 Proben bayerischer Tank- und Konsummilch auf Rückstände von Antibiotika und Sulfonamiden untersucht. Während die Tankmilchproben (n = 420) von einer Molkerei zur Verfügung gestellt wurden, stammte die Konsummilch (n = 198; 62,1 % pasteurisierte und 37,9 % ultrahocherhitzte Milch) aus dem lokalen Einzelhandel. Alle Proben wurden zunächst mit einem amtlichen Verfahren auf Hemmstoffe untersucht. Im Anschluss daran folgte ein Screening mit Enzymimmuntests (EIA) zum Nachweis von Fluorchinolonen, Isoxazolyl-Penicillinen, den Aminoglykosiden Gentamicin, Neomycin und Streptomycin, sowie von Tetracyclinen und Sulfadiazin. Hierfür wurden bereits etablierte Testsysteme verwendet und an die jeweiligen Erfordernisse angepasst. Die Nachweisgrenzen der einzelnen EIA's lagen im Bereich von 0,1 ng/ml (Enrofloxacin) bis 128 ng/ml (Neomycin) und damit in der Regel um Faktor 10 unter den rechtlich festgesetzten Rückstandshöchstwerten (MRL) des jeweiligen Arzneimittels. Die Wiederholbarkeit der Screening-Verfahren wurde anhand der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten bestimmt.

Von den 420 Tankmilchproben konnte im ersten EIA-Untersuchungsgang bei 9,52 % und von den 198 Konsummilchproben bei 8,95 % eine Rückstandsbelastung nicht ausgeschlossen werden, so dass entsprechende Nachuntersuchungen vorgenommen wurden. Hierbei konnten mit den eingesetzten enzymimmunologischen Untersuchungsverfahren keine Fluorchinolone, Aminoglykoside und Tetracycline nachgewiesen werden. Bei einer Konsummilchprobe konnten nach Extraktion über Immunaффinitätschromatographie (IAC) mittels EIA 2,3 µg/kg Isoxazolylpenicillin-Äquivalente nachgewiesen werden. Auch auf die Anwesenheit von Sulfadiazin wurden auffällige Milchproben stichprobenartig mittels IAC analysiert. Dabei konnte bei keiner der Proben der Verdacht auf einen Rückstand bestätigt werden.

Drei im Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)-Verfahren auffällige Proben wurden zur Absicherung und Quantifizierung der Ergebnisse mit einem Penicillin G – EIA untersucht. Bei zwei Proben (Tankmilch) wurden dabei Rückstände (unterhalb der gesetzlichen Höchstmenge) von 1,17 bzw. 1,25 µg/kg eines Penicillins nachgewiesen.

## Summary

### **Studies on the occurrence of antimicrobials in Bavarian market and bulk milk**

In total, 618 bulk and market milk samples from Bavaria were analysed from 2006 to 2007 for residues of antibiotics and sulfonamides. While bulk milk samples (n = 420) were provided by a local dairy, the market milk (n = 198; 62.1 % pasteurised and 37.9 % UHT milk) were purchased in local retail stores. At first, all samples were tested for inhibitors following an official procedure. Using enzyme immunoassays (EIA), samples were then screened for fluorquinolones, isoxazolyl penicillins, aminoglycosides (gentamicin, neomycin and streptomycin), tetracyclines and sulfadiazine. For this purpose, previously established assays were adapted to the respective demands. The detection limits of the individual EIA's varied from 0.1 ng/ml (enrofloxacin) to 128 ng/ml (neomycin). Thus, detection limits were well below (at least by a factor of 10) the maximum residue limits (MRL) of the respective antimicrobials. To show the repeatability of the methods, intra- and inter-assay precisions coefficients of variation were determined.

In the first screening tests, 9.52 % of the bulk milk and 8.95 % of the market milk samples showed unclear results and were re-examined to exclude the presence of drug residues. For fluorquinolones, aminoglycosides and tetracyclines, all samples were negative by immunochemical analyses. Using a clean-up procedure based on immunoaffinity chromatography (IAC), 2.3 µg/kg isoxazolyl penicillin equivalents were found in one market milk sample. In the same way, suspicious samples were randomly analysed by IAC for the presence of sulfadiazine. In none of the samples, sulfadiazine could be found.

Three samples which had reacted slightly positive in the brilliant black reduction test were analysed with a penicillin G-EIA for confirmation and quantification of the results. In two samples (bulk milk) penicillin residues could be detected at concentrations below the MRL of 1.17 and 1.25 µg/kg.

## 6 Literaturverzeichnis

ABUKNESHA, R.A. und C. LUK (2005):

Enzyme immunoassays for the analysis of streptomycin in milk, serum and water:  
development and assessment of a polyclonal antiserum and assay procedures using novel  
streptomycin derivates

Analyst **130**, 964-970

ACRIS ANTIBODIES GMBH (2007)

Monoclonal Antibody to Gentamicin/Neomycin

Produktinformation

AIM (Analytik in Milch GmbH, 2005):

Brillantschwarz-Reduktionstest, Basisinformation und Hintergründe

Produktinformation

AKE, M., H.I. TRAORE und A.K. MALAN (2006):

Liquid chromatographic determination of benzylpenicillin residues in milk

Sci. Alim. **2**, 181-188

AKSU, H., O. CETIN, O. ARUN und O. ERGUN (2004):

Determination of tetracyclin and streptomycin residues by means of ELISA in pasteurized and  
UHT-sterilized milk

Medydyzna Weterynaryjna **60**, 1171-1173

AKTORIES K., U. FÖRSTERMANN, F. HOFMANN und K. STARKE (2005):

Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie

Elsevier, München

ALBRECHT, M. und C. BAUMGARTNER (2006):

Die neuen Verordnungen der EU zur Milchhygiene. Was ist neu für Milcherzeuger?

MilchPur **Jhg. 06** (1), 10-13

ALLARA, M., P. IZQUIERDO, G. TORRES und B. RODRIGUEZ (2002):  
Penicillin G in pasteurized milk produced in Zulia State – Venezuela  
Rev. Cien.-Fac. Cien. V. **12**, 683-687

APPELBAUM, P.C. und P.A. HUNTER (2000):  
The fluorquinolone antibacterials: past, present and future perspectives  
Int. J. Antimicrob. Agents **16**, 5-1

BAUMGARTNER, C. (2006):  
Vermeidung von Rückständen nach Behandlung mit Antibiotika. Kuh gesund – Milch auch?  
MilchPur **Jhg. 06** (2), 34-36

BAYNES, R.E., R. LYMAN, K.L. ANDERSON und C.F. BROWNIE (1999):  
A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three Caribbean  
basin countries  
J. Food Prot. **62**, 177-180

BEHMENBURG, D. (1999):  
Modelluntersuchungen zur Eignung der Immunaффinitätschromatographie für die Isolierung  
von Isoxazolympenicillinen und Sulfamethazin  
Diss. med. vet. München

BFT (BUNDESVERBAND FÜR TIERGESUNDHEIT, 2005):  
Tierarzneimittelmarkt 2005 in Deutschland  
Tiergesundheit im Blickpunkt **51**, 3

BFT (BUNDESVERBAND FÜR TIERGESUNDHEIT, 2006):  
Tierarzneimittelmarkt 2006 in Deutschland  
Tiergesundheit im Blickpunkt **54**, 3

BOATMAN, M. (1998):

Survey of Antimicrobial Usage in Animal Health in the European Union

Boatman Consulting, Sept. 1998, by order of FEDESA

zitiert nach: MÜLLER-BAHRDT, D. (2004), Diss. med. vet. Leipzig

BONFOH B., S. DEM, O. KEITA, S. DELORENZI, H. TRAORE, C.F. SIMBE, I.O.

ALFAROUKH, Z. FARAH, J. NICOLET und J. ZINSSTAG (2003):

Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in

Bamako (Mali)

Milchwiss. **58**, 304-307

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2003):

Antibiotika-Resistenz bei Keimen in der Fleischproduktion zu hoch

<http://www.bfr.bund.de/cd/2040>

Stand: 24.03.2008

BURGIS, E. (2005):

Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pharmakologie

Elsevier, München

BVL (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND

LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2001):

Jahresbericht 2001 zum nationalen Rückstandskontrollplan

[http://www.bvl.bund.de/cln\\_007/nn\\_494194/DE/01\\_\\_Lebensmittel/01\\_\\_Sicherheit\\_\\_Kontrollen/04\\_\\_NRKP/01\\_\\_berichte\\_\\_nrkp/nrkp\\_\\_bericht\\_\\_2000\\_\\_2001.html\\_nnn=true](http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_494194/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/01__berichte__nrkp/nrkp__bericht__2000__2001.html_nnn=true)

Stand: 24.03.2008

BVL (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND

LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2006):

Jahresbericht 2005 zum nationalen Rückstandskontrollplan

[http://www.bvl.bund.de/cln\\_007/nn\\_494194/DE/01\\_\\_Lebensmittel/01\\_\\_Sicherheit\\_\\_Kontrollen/04\\_\\_NRKP/01\\_\\_berichte\\_\\_nrkp/nrkp\\_\\_bericht\\_\\_2005.html\\_nnn=true](http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_494194/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/01__berichte__nrkp/nrkp__bericht__2005.html_nnn=true)

Stand: 24.03.2008

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 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

CHEN, Y.-Q., Y.-H. SHANG, X.-P. WU, Y.-T. QI und X.-L. XIAO (2007):

Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of neomycin in milk: effect of hapten heterology on assay sensitivity

Food Agric. Immunol. **18**, 117-128

CITAK, S., A. MENDI und S. ORHAN (2005):

Incidence, antibiotic resistance and some technological properties of Enterococcus species isolated from raw milk and white cheese samples

Arch. Lebensmittelhyg. **56**, 80-83

DAYAN, A.D. (1993):

Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man

Vet. Microbiol. **35**, 231-226

DEUTZ, A. und W. OBRITZHAUSER (2003):

Eutergesundheit und Milchqualität - Krankheiten erkennen, vorbeugen, behandeln

Leopold Stocker, Graz

DIANA F., M. PALEOLOGO und L. PERSIC (2007):

Validation of two enzyme immunoassays for aminoglycoside residues according to European Decision 657/2002

Food Addit. Contam. **24**, 1345-1352

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

Use of monoclonal antibodies for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk  
Euroresidue III: Conference on Residues of Veterinary Drugs in Foods.

HAAGSMA, N. und A. RUITER (Hrsg.) University of Utrecht, Niederlande, S. 382-386

DIETRICH, R., P. DUELLI, A. GÄRTNER, A. URABL, E. MÄRTLBAUER (2008):

Development of group-specific monoclonal antibodies for the detection of quinolone  
antibiotics

Veröffentlichung in Vorbereitung

DOMAGK, G. (1935):

Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen

Dtsch. Med. Wschr. 7, 250-256

EDMONDSON, P. (2003):

Avoidance of medicines residues in milk

In Practice **25**, 278-283

EKINS, R.P. (1985):

Current concepts and future developments

In: COLLINS, W.P. (Hrsg.): Alternative Immunoassays, pp. 219-237

John Wiley & Sons

EMEA (1999):

Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary  
medicines

Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medical Products,

Juli 1999

ERMOLENKO, D.N., S.A. EREMIN, A.A. MART'IANOV, A.V. ZHERDEV und B.B.  
DZANTIEV (2007):

A new generic enzyme immunoassay for sulfonamides

Anal. Lett. **40**, 1047-1062

ERSKINE , R.J., S. WAGNER und F.J. DEGRAVES (2003):

Mastitis therapy and pharmacology

Vet. Clin. N. Am.-Food A. **19**, 109-138

EUROVET (2007):

Lila Liste, 22. Auflage

Delta, Berlin

FITZGERALD, S.P., N. O'LOAN, R.I. McCONNEL, E.O. BENCHIKH und N.E. KANE

(2007):

Stable competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit for rapid measurement of 11 active beta-lactams in milk, tissue, urine and serum

AOAC **90**, 334-342

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

GAUDIN, V., N. CADIEU und P. SANDERS (2004):

Results of a European proficiency test for the detection of streptomycin/dihydrostreptomycin, gentamicin and neomycin in milk by ELISA and biosensor methods

Anal. Chim. Acta **529**, 273-283

GÄRTNER, A. (2006):

Entwicklung und Charakterisierung von Enzymimmuntests für den Nachweis von Fluorchinolonen

Diss. med. vet. München

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

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**, 453-460

GDCH (GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER, 2002):  
Schnelltestmethoden  
Broschüre der Arbeitsgruppe pharmakologisch wirksamer Stoffe

GLOMBITZA, K.-W. (1964):  
Acylierung der 6-Amino-Penicillansäure in wasserfreiem Medium  
Justus Liebigs Annalen der Chemie **673**, 166-170

GODDEMEIER, C. (2006)  
Alexander Fleming (1881-1955): Penicillin  
Dt. Ärzteblatt **36**, 2286

GOWIK, P. (2006):  
Das Europäische Netzwerk für die Rückstandskontrolle  
J. Verbr. Lebensm. **1**, 222-227

GRAVERET, O. (1983)  
Die Milch  
Ulmer, Stuttgart

GROHE, K. (1998):  
The Chemistry of the Quinolones: Methods of Synthesizing the Quinolone Ring System  
Quinolone antibacterials, 13-62  
Springer, Berlin

GROSSKLAUS, D. (1989):  
Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln  
Parey, Berlin

HEISIG, P. (2006):  
Wirkungs- und Resistenzmechanismen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika  
Pharm. Unserer Zeit **5**, 400-408

JEON, M., J. KIM, K.-J. PAENG, S.-W. PARK und I.R. PAENG (2008):  
Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk  
Microchem. J. **88**, 26-31

JIN, Y., J.-W. JANG, C.-H. HAN und M.-H. LEE (2005):  
Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamycin  
J. Agric. Food Chem. **53**, 7639-7643

JIN, Y., J.-W. JANG, C.-H. HAN und M.-H. LEE (2006a):  
Development of immunoassays for the detection of kanamycin in veterinary fields  
J. Vet. Sci. **7**, 111-117

JIN, Y., J.-W. JANG, M.-H. LEE und C.-H. HAN (2006b):  
Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin  
Clin. Chim. Acta **364**, 260-266

JUNG, C. (1996):  
Rückstandskontrolle mit Schnelltestmethoden  
Dt. Milchwirtsch. **47**, 543-544

KANG, J.H., J.H. JIN und F. KONDO (2005):  
False-positive outcome and drug residue in milk samples over withdrawal times  
J. Dairy Sci. **88**, 908-913

KANG'ETHE, E.K., G.O. ABOGE, S.M. ARIMI, L.W. KANJA, A.O. OMORE und J.J. McDERMOTT (2005):  
Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya  
Food Control **16**, 349-355

KIRST, E. (1992):  
Hemmstoffe in der Rohmilch  
Unser Milchvieh **44**

KNECHT, B.G., 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

KRABISCH, P., A. GANGL, G. WITTKOWSKI und K. FEHLINGS (1999):

Prävalenz der Antibiotika-Resistenz in Milchviehherden bei Infektionserregern mit humanmedizinischer Bedeutung

Chemother. J. **6**, 210-218

KRESKEN, M. und D. HAFNER (2002):

Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Fluorchinolonen (Ciprofloxacin) in Mitteleuropa

Cemother. J. **11**, **Suppl. 20**, 18-24

KRESKEN, M., D. HAFNER, F.-J. SCHMITZ und T.A. WICHELHAUS (2006):

Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfung & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2004

Antiinfectives Intelligence, Rheinbach

KRESS, C., C. SEIDLER, B. KERP, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2007):

Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples

Anal. Chim. Acta **586**, 275-279

KRÖMKER, V. (2007):

Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene

Parey, Stuttgart

KROKER, R. (1999):

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, pp. 211-246

Parey, Berlin

KURWIJILA, L.R., A. OMORE, S. STAAL und N.S.Y. MDOE (2006):

Investigation of the risk of exposure to antimicrobial residues present in marketed milk in Tanzania

J. Food Prot. **69**, 2487-2492

LANG, B.R., E. MÄRTLBAUER, und G. TERPLAN (1992):

Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclin in Milch

Arch. Lebensmittelhyg. **43**, 77-79

LAUEN, K. S. (2006):

Erhebungen zum Arzneimitteleinsatz durch bayerische Tierärzte bei Lebensmittel liefernden Tieren

Diss. med. vet. München

LOCHBIHLER, E. (1994):

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

Diss. med. vet. München

LÖSCHER, W. (2006):

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren

Parey, Stuttgart

MÄRTLBAUER, E., R. MEIER, E. USLEBER und G. TERPLAN (1992):

Enzyme immunoassays for the detection of sulfamethazine, sulfadiazine, sulfamethoxypyridazine and trimethoprim in milk

Food Agric. Immunol. **4**, 219-228

MÄRTLBAUER, E. (1993):

Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe

Enke, Stuttgart

MÄRTLBAUER, E., E. USLBEBER, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH (1994):

Immunochemical Detection of Antibiotics and Sulfonamides

Analyst **119**, 2543-2548

MÄRTLBAUER, E., A. STRASSER, R. DIETRICH, K.-J. ZAADHOF, M.G. WELLER,

B.G. KNECHT und R. NIESSNER (2002):

Miniaturisierte Biosensoren zur Sicherung der Qualität von Milchprodukten

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Garching 2002

MEIER, R. (1991):

Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Sulfonamiden in Milch

Diss. med. vet. München

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2002):

Tätigkeitsberichte 2000, 2001 und 2002

<http://www.mpr-bayern.de/3.1/mpr.de/index.php?StoryID=2156>

Stand: 24.03.08

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2005):

Hemmstoff-Abzüge und Prozentanteil in den Regierungsbezirken Bayerns 2005

<http://www.mpr-bayern.de/3.1/mpr.de/index.php?StoryID=2566>

Stand: 14.11.2007

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2006):

Hemmstoff-Abzüge und Prozentanteil in den Regierungsbezirken Bayerns 2006

<http://www.mpr-bayern.de/3.1/mpr.de/index.php?StoryID=2736>

Stand: 24.03.2008

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

J. Food Prot. **61**, 742-756

MÜLLER, G. (2006):

Das neue EU-Recht – Was es für die Milcherzeuger bedeutet. Zum Wohle des Verbrauchers  
MilchPur **Jhg. 206** (1), 20-22

MÜLLER-BAHRDT, D. (2004):

Entwicklung des Einsatzes antimikrobiell wirksamer Tierarzneimittel in  
Fütterungsarzneimitteln in Sachsen-Anhalt in den Quartalen 03/2000, 01/2001 und 01/2002  
und einer ausgewählten Großtierpraxis im 1. Quartal 2002

Diss. med. vet. Leipzig

MUTSCHLER, E., G. GEISSLINGER, H.K.KROEMER und M. SCHÄFER-KORTING  
(2001):

Arzneimittelwirkungen

Wissenschaftl. Verlagsges. Stuttgart

NAU, H., P. STEINBERG und M. KIETZMANN (2003):

Lebensmitteltoxikologie

Parey, Berlin

NEAVES, P. (1999a):

Monitoring antibiotics in milk – the changing world of test methods

British Mastitis Conference 1999

NEAVES, P. (1999b):

Comparative sensitivities of Delvotest P, Delvotest SP and Delvotest MCSd tests for the  
detection of antimicrobials in milk

British Mastitis Conference 1999

OSTERMAIER, S. (1994):

Entwicklung und Charakterisierung von enzymimmunologischen Schnelltestverfahren zum Nachweis von Sulfonamiden in Milch

Diss. med. vet. München

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

Antibiotika-Fibel

Thieme, Stuttgart

OWENS, W.E., J.L. WATTS und R.L. BODDIE (1988):

Antibiotic treatment of mastitis: Comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies

J. Am. Vet. Med. Assoc. **169**, 1104-1109

PACKHAM, W., M.C. BROOME, G.K.Y. LIMSOWTIN und H. ROGINSKI (2001):

Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking

Austr. J. Dairy Techn. **56**, 15-18

PALLETT, P. (1988):

Tetracycline

Brit. J. Hosp. Med. **40**, 385-389

PASTOR-NAVARRO, N., S. MORAIS, À. MAQUIEIRA und R. PUCHADES (2007):

Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues

Application to honey samples

Anal. Chim. Acta **594**, 211-218

PIRRO, F., A. DE JONG, R. FROYMAN, H.A. GREIFE und N. SCHMEER (1999):

Resistenz-Monitoring am Beispiel eines zugelassenen Fluorchinolons

Tierärztl. Praxis **6**, 329-335

QUANDT, B. (2006):

Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch mittels Schnelltestsyste-men

Diss. med. vet. München

RASSOW, D. und H. SCHAPER (1996):

Zum Einsatz von Fütterungsarzneimitteln in Schweine- und Geflügelbeständen in der Region  
Weser-Ems

Dtsch. tierärztl. Wschr. **103**, 237-284

RAULEDER, D.N. (2002):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Säuglings- und Kleinkindernahrung

Diss. med. vet. München

SAMSONOVA, J.V., M.L.BASHKUROV, N.L. IVANOVA, M.Y. RUBTSOVA und A.M.  
EGOROV (2005a):

ELISA of streptomycin in buffer and milk: Effect of reagents' structure and analysis format  
on assay performance

Food Agric. Immunol. **16**, 47-57

SAMSONOVA, J.V., O.S. SHCHELOKOVA, N.L. IVANOVA, M.Y. RUBTSOVA und  
A.M. EGOROV (2005b):

Enzyme linked immunosorbent assay of ampicillin in milk

Appl. Biochem. Microbiol. **41**, 668-675

SAWANT, A.A., L.M. SORDILLO und B.M. JAYARAO (2005):

A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania

J. Dairy Sci. **88**, 2991-2999

SCHÄLLIBAUM, M. (1990)

Antibiotikatherapie und Rückstände in der Anlieferungsmilch

Swiss Vet. **7**, 7-9

SCHIFFMANN, A.P., M. SCHUTZ und H.U. 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

SCHMÄDICKE, I. (2006):

Nationaler Rückstandskontrollplan – Stärkung des Verbraucherschutzes durch gezielte Kontrollen bei tierischen Lebensmitteln

J. Verbr. Lebensm. **1**, 51-56

SCHMIDT, H. (2007):

Pharmakologie und Toxikologie

Schattauer, Stuttgart

SCHNAPPINGER, P., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1993):

Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk  
Food Agr. Immunol. **5**, 67-73

SCHÜTTEL, M., J. APEL und C.-L. RIEDEL (2000):

Güteprüfung nach der Landesgüteverordnung-Milch in Nordrhein-Westfalen: Ergebnisse für wärmebehandelte Konsummilch von Januar 1997 bis Juni 1999

Arch. Lebensmittelhyg. **51**, 36-42

SCHULZE, S.R. (2002):

Zum Nachweis von Hemmstoffen und Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen- und Stutenmilch

Diss. med. vet. München

SHITANDI A., und A. STERNESJÖ (2001):

Detection of antimicrobial drug residues in Kenyan milk

J. Food Safety **21**, 205-214

SHITANDI A., und A. STERNESJÖ (2004):

Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk  
J. Food Prot. **67**, 399-402

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

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

STEIN, G.E. (1988):

The 4-quinolone antibiotics: past, present and future  
Pharmacother. **8**, 301-314

STRASSER, A. (2003):

Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch –  
Herstellung der immunchemischen Komponenten  
Diss. med. vet. München

STRASSER, A., E. USLEBER, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH, C. BÜRK und E.

MÄRTLBAUER (2003):

Improved Enzyme Immunoassay for Group-Specific Determination of Penicillins in Milk.  
Food. Agr. Immunol. **15**, 135-143

SUHREN G. (2002):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch – rechtliche Grundlagen,  
Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme  
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54**, 35-73

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

UNGEMACH, F.R. (1999):

Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang  
Tierärztl. Praxis **27**, 335-340

UNGEMACH, F.R. (2000):

Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation

Acta vet. scand. **Suppl. 93**, 89-93

UNGEMACH, F.R. (2004):

Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin und die Auswirkung von Antibiotika-Leitlinien.  
Symposium der Akademie für Tiergesundheit (AfT) e.V. Leipzig, 2004

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

Enzyme immunoassay for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk

Analyst **119**, 2765-2768

WALLMANN, J. (2004):

Resistenzsituation pathogener bakterieller Erreger bei Nutztieren in Deutschland

Symposium der Akademie für Tiergesundheit (AfT) e.V. Leipzig, 2004

WALKENHORST, M. (2006):

Vergleich von homöopathischer mit antibiotischer Laktationstherapie zur Behandlung von Mastitiden des Rindes

Diss. med. vet. Zürich

WALSER, K., B. GANDORFER, A. STEINBERGER, E. TREITINGER und T. WINTER (1993):

Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität und Pharmakokinetik von Enrofloxacin (Baytril®) bei der laktierenden Kuh

Tierärztl. Umschau **48**, 414-419

WATANABE, H., A. SATAKE, Y. KIDO und A. TSUJI (2002):  
Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for enrofloxacin in biological matrices  
*Analyst* **127**, 98-103

WITTE, W. (2004):  
Ausbreitung von resistenten Bakterien und von Resistenzgenen zwischen Mensch und Tier  
Symposium der Akademie für Tiergesundheit (AfT) e.V. Leipzig, 2004

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

WOODWARD, K.N. (1993):  
Maximum residue limits – the impact of UK and EC legislation  
*Recent Adv. Anim. Nutr.*, 165-172

ZIV, G. (1980):  
Drug selection and use in mastitis: systemic vs. local therapy  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**, 1109-1115

## 7 Anhang

### **Zitierte Gesetze, Verordnungen Richtlinien und Entscheidungen**

**Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz – AMG)** in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I, 3394) zuletzt geändert durch Artikel 9 Abs. 1 des Gesetzes vom 23. November 2007 (BGBl. I, 2631)

**Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB)** in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl. I, 945), zuletzt geändert durch Artikel 12 des Gesetzes vom 26. Februar 2008 (BGBl. I, 215)

**Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung)** vom 9. Juli 1980 (BGBl. I, 878, 1081), zuletzt geändert durch Artikel 17 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I, 1816)

**Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV)** in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Dezember 2006 (BGBl. I, 3455)

**Verordnung (EG) Nr. 882/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 165, 1-141. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 180/2008 der Kommission vom 28. Februar 2008.

**Verordnung (EG) Nr. 854/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 139, 206-320. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 1791/2006 des Rates vom 20. November 2006.

**Verordnung (EG) Nr. 853/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 139, 55-205. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 1243/2007 der Kommission vom 24. Oktober 2007.

**Verordnung (EG) Nr. 852/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. Amtsblatt der Europäischen Union 2004, L 139, 1-54. Zuletzt geändert durch Berichtigung der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 (Amtsblatt der Europäischen Union 2008, L 56, 4-7).

**Verordnung (EG) Nr. 178/2002** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Amtsblatt der Europäischen Union 2002, L 31, 1-24. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 202/2008 der Kommission vom 4 März 2008.

**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. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft 1990, L 224, 1-8. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 61/2008 der Kommission vom 24. Januar 2008.

**Richtlinie 96/23/EG** des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG. Amtsblatt der Europäischen Union 1996, L 125, 10-32. Zuletzt geändert durch Richtlinie 2006/104/EG des Rates vom 20. November 2006.

**2006/694/EG: Entscheidung** der Kommission vom 13. Oktober 2006 zum Verbot des Inverkehrbringens des in einer Molkerei im Vereinigten Königreich hergestellten Frischkäses (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2006) 4877). Amtsblatt der Europäischen Union 2006, L 283, 59-61. Zuletzt geändert durch 2007/148/EG: Entscheidung der Kommission vom 2. März 2007.

**2002/657/EG: Entscheidung** der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 3044). Amtsblatt der Europäischen Union 2002, L 221, 8-36. Zuletzt geändert durch 2004/25/EG: Entscheidung der Kommission vom 22. Dezember 2003.

**97/747/EG: Entscheidung** der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probennahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen. Amtsblatt der Europäischen Union 1997, L 303, 12-15.

#### **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB:**

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

Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch - Agar-Diffusionsverfahren (Brilliant-schwarz-Reduktionstest); L 01.01-5

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

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformeln einiger wichtiger Verbindungen aus der Gruppe der Penicilline	18
Abb. 2:	Strukturformeln einiger Aminoglykosidantibiotika	22
Abb. 3:	Grundaufbau veterinärmedizinisch interessanter Tetracycline	25
Abb. 4:	Strukturformeln von Fluorchinolonen, die für Rinder, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird, zugelassen sind	28
Abb. 5:	Strukturformeln von Sulfanilamid und Sulfadiazin	31
Abb. 6:	Typische Anordnung von Standards und Proben auf einer Mikrotiterplatte beim EIA-Screening	48
Abb. 7:	Herkunft der untersuchten bayerischen Konsummilchproben	49
Abb. 8:	Schematische Darstellung des Testdurchführung eines simultan kompetitiven, direkten Enzymimmuntests basierend auf der Doppel-Antikörper-Technik am Beispiel des Nachweises von Fluorchinolonen	53
Abb. 9:	Schematische Darstellung der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung von Milchproben zum Nachweis von Sulfadiazin bzw. Cloxacillin	58
Abb. 10:	Typische Standardkurven für den Nachweis von Fluorchinolonen im simultan kompetitiven, direkten Enzymimmuntest	61
Abb. 11:	Typische Standardkurven für den Nachweis von Cloxacillin im simultan kompetitiven, indirekten Enzymimmuntest	63
Abb. 12:	Typische Standardkurven für den Nachweis von Tetracyclinen im simultan kompetitiven, indirekten Enzymimmuntest	72
Abb. 13:	Standardkurven der verwendeten EIA-Testsysteme zum Nachweis von Antiinfektiva in Tankmilch	80

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verbrauchsmengen verschiedener im Jahre 1997 eingesetzter Antiinfektiva in der Veterinärmedizin in der EU und der Schweiz	5
Tab. 2:	Zusammenstellung neuerer Arbeiten zur Belastungssituation von Milch mit Antibiotika- und Sulfonamid-Rückständen	9
Tab. 3:	Rückstandshöchstmengen (MRL) einiger ausgewählter pharmakologisch wirksamer Stoffe, die für Milchkühe zugelassen sind	15
Tab. 4:	Überblick über gängige mikrobiologische und physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Antibiotika- und Sulfonamid-Rückstände in Milch	34
Tab. 5:	Zusammenstellung ausgewählter neuerer Arbeiten zum Nachweis von Antiinfektiva in Milch mittels Enzymimmuntests	39
Tab. 6:	Übersicht zu den für die Erstellung der Enzymimmuntests eingesetzten Antikörpern, sowie Angaben zu deren Spezifität (rel. Kreuzreaktionen)	45
Tab. 7:	Aufschlüsselung der untersuchten Konsummilchproben im Hinblick auf Erhitzungsverfahren und Fettgehalt	50
Tab. 8:	Zum enzymimmunologischen Nachweis von Fluorchinolonen in Tank- bzw. Konsummilch eingesetzte Reagenzien	52
Tab. 9:	Indirekt kompetitive Enzymimmuntests zum Nachweis verschiedener Antibiotika	55
Tab. 10:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Fluorchinolonen	62
Tab. 11:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Isoxazolyl-Penicillinen	64
Tab. 12:	Extinktionswerte des Eluats der Isoxazolylpenicillin-positiven Konsummilchprobe im EIA	65
Tab. 13:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Gentamicin	66
Tab. 14:	Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Gentamicin	67
Tab. 15:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Neomycin	68
Tab. 16:	Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis	

	von Neomycin	69
Tab. 17:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Streptomycin	70
Tab. 18:	Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Streptomycin	71
Tab. 19:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Tetracyclinen	73
Tab. 20:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Sulfadiazin	74
Tab. 21:	Reproduzierbarkeit der Standardkurven im EIA zum Nachweis von Sulfadiazin	75
Tab. 22:	Vergleich zwischen den Nachweisgrenzen der durchgeführten EIAs (Rohmilch) und den MRL-Werten des jeweiligen Analyts	81

## **DANKSAGUNG**

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

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Dietrich für die große Geduld und seine Hilfestellung während der Anfertigung dieser Arbeit ebenso bedanken wie für die zahlreichen Anregungen und die große Sorgfalt bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Urabl für die Vorbereitungen zu dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung in der Anfangsphase.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima und die jederzeit gewährte Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Mosteffa Djefall für die angenehme Zusammenarbeit und die verlässliche Unterstützung in Notsituationen.

Ebenso möchte ich mich bei den Verantwortlichen des TIZIAN-Projektes am LGL Erlangen für das Verständnis bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau Anna, die mir während der ganzen Zeit durch ihren aufopfernden Einsatz den Rücken freigehalten hat. Mit ihrer Geduld, ihrer Motivation und ihrer Unterstützung hat sie diese Arbeit erst ermöglicht.

## LEBENS LAUF

- Peter Duelli** Geboren am 20. Januar 1975 in Überlingen
- Eltern:** Anita Duelli, geb. Stett  
Otto Duelli
- Schulbildung:** 1981-1985 Grundschule in Denkingen  
1985-1994 Gymnasium in Pfullendorf
- Grundwehrdienst:** 1994-1995 Generaloberst-v.-Fritsch-Kaserne in Pfullendorf
- Berufsausbildung:** 1995-1998 Ausbildung zum Bankkaufmann an der  
Volksbank Pfullendorf eG
- Studium:** 1998-2005 Studium der Tiermedizin an der Ludwigs-  
Maximilians-Universität München
- Staatsexamen:** 24.01.2005
- Approbation:** 08.04.2005
- Berufliche Tätigkeiten:** Beginn der Promotion im April 2005. Von Mai 2006 bis Juni  
2007 als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für  
Hygiene und Technologie der Milch der tierärztlichen Fakultät  
der LMU München beschäftigt. Derzeit am Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen angestellt.