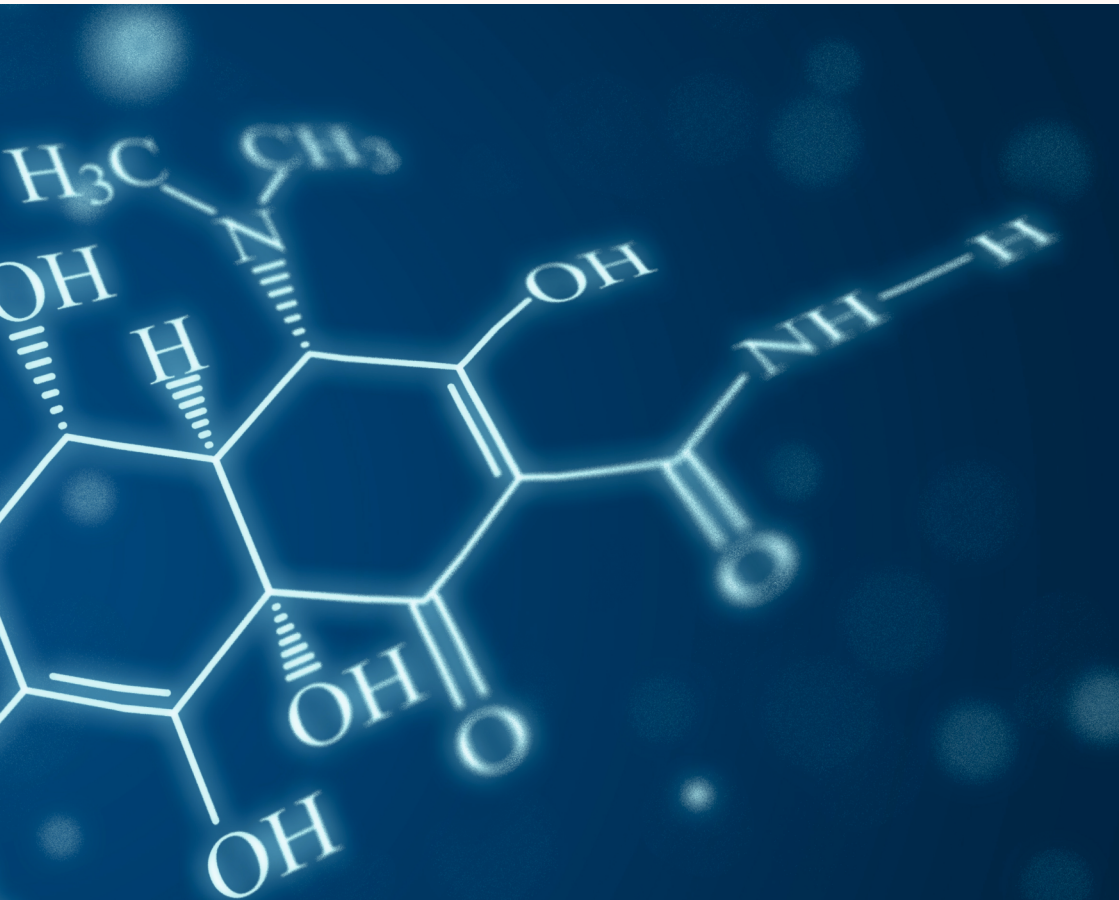


Enzymimmunttest zum Nachweis von Oxytetracyclin in Lebensmitteln

Sabine Reitzenstein



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.** beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

Enzymimmuntest zum Nachweis von Oxytetracyclin in Lebensmitteln

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sabine Reitzenstein

Tierärztin aus Traben-Trarbach

Gießen 2017

Meiner Familie
&
meiner Großmutter
Elisabeth Reitzenstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	<i>Charakterisierung der Tetracycline</i>	3
2.1.1	Chemie	3
2.1.2	Pharmakologie	5
2.1.3	Einsatzgebiete und Indikationen	6
2.1.3.1	Humanmedizin	7
2.1.3.2	Veterinärmedizin	8
2.1.3.3	Pflanzenbau	10
2.2	<i>Bewertung durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA)</i>	10
2.3	<i>Rückstandsverhalten</i>	11
2.4	<i>Gesetzliche Grundlagen und Überwachung der Rückstandssituation</i>	13
2.4.1	Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs	13
2.4.2	Nationaler Rückstandskontrollplan und Importwarenuntersuchung	15
2.4.3	Europäisches Schnellwarnsystem	16
2.5	<i>Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln</i>	17
2.5.1	Mikrobiologische Nachweisverfahren	18
2.5.2	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	19
2.5.3	Immunologische Nachweisverfahren	20
2.5.4	Kombinierte Verfahren	28
3	Material und Methoden	32
3.1	<i>Materialien und Geräte</i>	32
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	32
3.1.2	Antibiotika	33
3.1.3	Immunreagenzien	33
3.1.4	Puffer und Lösungen	33
3.1.5	Geräte und Hilfsmittel	34
3.1.6	Versuchstiere	35

3.1.7	Probenmaterial	35
3.2	<i>Methodik</i>	36
3.2.1	Herstellung der Immunreagenzien	36
3.2.1.1	Formaldehydmethode	36
3.2.1.2	Kopplung mittels Glutardialdehydkondensation	38
3.2.1.3	Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat	41
3.2.2	Gewinnung spezifischer Antisera	43
3.2.2.1	Immunisierung	43
3.2.2.2	Kontrolle des Immunisierungsverlaufs	44
3.2.2.3	Auswahl geeigneter Antisera durch parallele kompetitive Titration (Hemmtitration)	45
3.2.3	Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Oxytetracyclin	46
3.2.3.1	Kompetitiver direkter Enzymimmuntest	46
3.2.3.2	Kompetitiver direkter Enzymimmuntest unter Verwendung einer Doppelantikörpertechnik	48
3.2.3.3	Kompetitiver indirekter Enzymimmuntest	49
3.2.3.3.1	Durchführung	49
3.2.3.3.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	50
3.2.3.3.3	Ermittlung der Spezifität der Testsysteme	51
3.2.4	Untersuchung von Lebensmitteln	54
4	Ergebnisse	55
4.1	<i>Herstellung der Protein- und Enzymkonjugate</i>	55
4.2	<i>Gewinnung spezifischer Antisera gegen Oxytetracyclin</i>	55
4.2.1	Immunisierungsverlauf	55
4.2.2	Auswahl geeigneter Antisera	57
4.3	<i>Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Oxytetracyclin</i>	58
4.3.1	Entwicklung direkter kompetitiver Enzymimmuntests	58
4.3.2	Entwicklung eines indirekt kompetitiven Enzymimmuntests	58
4.3.2.1	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	58
4.3.2.2	Spezifität	62

4.4	<i>Versuche zur Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests</i>	63
4.5	<i>Probenvorbereitung</i>	65
5	Diskussion	66
5.1	<i>Antikörper gegen Oxytetracyclin und Entwicklung enzymimmunologischer Nachweisverfahren</i>	67
5.2	<i>Anwendung des Enzymimmuntests</i>	69
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	73
8	Literaturverzeichnis	74
9	Anhang	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Höchstmengen (Maximum Residue Limit, MRL) für Tetracycline in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nach VO (EU) Nr. 37/2010, Tabelle I	14
Tabelle 2:	Nachweisgrenzen einiger kommerziell erhältlicher Testverfahren für Tetracycline	31
Tabelle 3:	Produktgruppen und Anzahl der Proben	35
Tabelle 4:	Übersicht über die verschiedenen Kopplungsprodukte	43
Tabelle 5:	Stabilität der OTC-Stammlösung (in Methanol) in Bezug auf den 50%- und 75%-Wert der Standardkurve	59
Tabelle 6:	Vergleich von 50%-Dosis und 75%-Dosis von OTC-Standardkurven hergestellt in 1,25% MMP-PBS nach unterschiedlicher Lagerungszeit (0-12 Tage)	60
Tabelle 7:	Charakteristika des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Oxytetracyclin unter Verwendung der optimierten Kombination aus Antiserum und Beschichtungsantigen	61
Tabelle 8:	Kreuzreaktivität des Antiserums von Kaninchen 3 gegen Oxytetracyclin mit anderen Tetracyclinen unter Verwendung verschiedener Beschichtungsantigene	63
Tabelle 9:	Wiederfindungsraten für Oxytetracyclin in künstlich kontaminierten Milchproben	64
Tabelle 10:	Wiederfindungsraten für Oxytetracyclin in künstlich kontaminierten Fischproben (Lachs und Kabeljau)	65
Tabelle 11:	Enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln	Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur einiger Tetracyclinderivate mit Kennzeichnung der bei entsprechender Substitution entstehenden Chiralitätszentren (•)	5
Abbildung 2:	Schema der Formaldehydmethode unter Darstellung beider möglicher Kopplungsstellen (a, b) am Beispiel des Oxytetracyclinmoleküls	37
Abbildung 3:	Schema der Glutarialdehydmethode am Beispiel der Kopplung von Oxytetracyclin an BSA	40
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der postulierten Kopplungsreaktion von Oxytetracyclin an HRP mittels reduktiver Alkylierung	42
Abbildung 5:	Plattenbelegung zur Durchführung der Hemmtitration	46
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Plattenbelegung bei Durchführung einer Schachbrett-Titration zur Ermittlung optimaler Konzentrationen der Immunreagenzien	48
Abbildung 7:	Aufbau eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests	53
Abbildung 8:	Relative Antiserumtiter der immunisierten Kaninchen Nr. 1, 2 und 3 nach Überprüfung im kompetitiven indirekten Testsystem unter Verwendung von OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren) als Festphasenantigen	56
Abbildung 9:	OTC-Standardkurven hergestellt in 1,25% MMP-PBS nach unterschiedlicher Lagerungszeit (0-12 Tage)	60
Abbildung 10:	Typische Standardkurve des kompetitiv indirekten Enzymimmuntests für Oxytetracyclin unter Verwendung von Antiserum K3 (gepoolt, Woche 11-21), verdünnt 1:3000 in PBS und Beschichtungskonjugat OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren)	62

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ADI	Acceptable Daily Intake, erlaubte Tagesdosis
AK	Antikörper
ASUV	Ämtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
BSA	Bovines Serumalbumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CDI	Carbonyldiimidazol
CT	Chlortetracyclin
d	dies, Tag
DAB	Deutsches Arzneibuch
DASP	Double Antibody Solid Phase, Doppelantikörpertechnik
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Enzymimmunoassay
EMA	European Medicines Agency, Europäische Arzneimittel-Agentur
et al.	et altera, und andere
EU	Europäische Union
EÜP	Einfuhrüberwachungsplan
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FA	Formaldehyd
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCA	Freund's complete adjuvant
g	Gramm
g	Gravitation, Erdbeschleunigung
GA	Glutardialdehyd
GOx	Glukoseoxidase

h	Stunde(n)
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LC	Liquid Chromatography, Flüssigchromatographie
LD	Letale Dosis
mAb	monoclonal Antibody, monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMP	Magermilchpulver
MRL	maximum residue limit, gesetzliche erlaubte nachweisbare Höchstmenge
n	Anzahl
NOEL	no-observed effect level, maximale Dosis ohne beobachtbaren Effekt
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
o.g.	oben genannt(es)
OTC	Oxytetracyclin
OVA	Ovalbumin
PABA	p-Aminobenzoesäure
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
pH	pondus/potentia Hydrogenii, Maß für den sauren/basischen Charakter einer wässrigen Lösung
RAPEX	Rapid Exchange of Information System
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
TC	Tetracyclin
Tab.	Tabelle

TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
TS	Trockensubstanz
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Der Einsatz von Antiinfektiva, insbesondere von Antibiotika bei lebensmittelliefernden Tieren und die damit verbundene Rückstandsproblematik sind im Hinblick auf den gesundheitlichen Verbraucherschutz und die technologische Qualität der Rohstoffe in der Lebensmittelbearbeitung von besonderer Bedeutung. Eine veterinärmedizinisch relevante Wirkstoffgruppe stellen gemäß Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) die Tetracycline dar (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2015a). Basis der Auswertung ist seit dem Jahr 2011 die Erfassung der jährlichen Abgabemengen von Antibiotika an Tierärzte gemäß DIMDI-Arzneimittelverordnung (DIMDI-AMV). Auch europaweit dominieren die Tetracycline im Vergleich zu anderen Antibiotikaklassen. Sie werden seit 2005 mit Abstand am häufigsten bei lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt (GRAVE et al., 2010; GRAVE et al., 2012; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014). Insbesondere Oxytetracyclin wird aufgrund des breiten Wirkungsspektrums sowie aus wirtschaftlichen Gründen weltweit in der Tiermedizin eingesetzt. So dient Oxytetracyclin auch als Leistungsförderer (CHOPRA und ROBERTS, 2001), wobei diese Anwendung in Europa jedoch aufgrund der VO (EG) 1831/2003 bereits seit 2006 untersagt ist. Oxytetracyclin findet hauptsächlich in der Schweinehaltung (SARMAH et al., 2006) und der Aquakultur (RIGOS und TROISI, 2005; TOLMIEN, 2011) Anwendung.

Um mögliche Gesundheitsgefährdungen der Verbraucher durch zu hohe Rückstandsmengen in Lebensmitteln tierischer Herkunft auszuschließen wurden die von der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA festgelegten Rückstandshöchstmengen (Maximum Residue Limit; MRL) für Tetracycline in Abhängigkeit des Zielgewebes, wie Muskel, Niere oder Milch, zwischen 100 µg/kg und 600 µg/kg festgesetzt. Die VO (EU) 37/2010 regelt europaweit den Einsatz pharmakologisch wirksamer Stoffe. Zu den in dieser Verordnung genannten Substanzen zählen neben Tetracyclin, auch Doxycyclin, Oxytetracyclin sowie Chlortetracyclin.

Der häufige Einsatz von Tetracyclinen, insbesondere von Oxytetracyclin, als Tierarzneimittel machte es notwendig, spezifische Antikörper zum immunchemischen Nachweis von Oxytetracyclin zu gewinnen.

Derzeit existieren kommerziell erhältliche Testsysteme, die zur Hemmstoffkontrolle von Milch eingesetzt werden. Die Nachweisgrenzen für einzelne Vertreter der Tetracycline liegen zwar meist unterhalb des MRL, allerdings ermöglichen nur wenige Testverfahren eine Identifizierung und gleichzeitige Quantifizierung der vorhandenen Hemmstoffe beziehungsweise Antibiotika.

Physikalisch-chemische, insbesondere chromatographische Methoden werden im Rahmen von Referenzmethoden eingesetzt, bedingen jedoch einen hohen materiellen, zeitlichen und personellen Aufwand. Zur Routinediagnostik eignen sich diese Verfahren zudem aufgrund der in der Regel aufwendigen Probenvorbereitung kaum.

Um die Vorteile der jeweiligen Systeme zu nutzen, werden im Rahmen eines integrierten Nachweissystems nach HEESCHEN und SUHREN (1996) verschiedene Testverfahren hintereinander geschaltet. Hierbei stellen Screeningverfahren, wie die immunchemischen Nachweisverfahren, aufgrund der einfachen und wirtschaftlichen Anwendung wichtige Routineuntersuchungsverfahren dar. Somit bestand Bedarf, ein enzymimmunologisches Nachweisverfahren zu entwickeln, welches im Rahmen eines integrierten Systems zum Nachweis von Oxytetracyclin in verschiedenen Lebensmitteln eingesetzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein bereits begonnenes Immunisierungsverfahren zur Herstellung von Antikörpern für Tetracycline fortgeführt und ein Enzymimmuntest zum spezifischen Nachweis von Oxytetracyclin entwickelt werden. Die Anwendbarkeit des Tests sollte mittels einer orientierenden Untersuchung zum Vorkommen von Oxytetracyclin in Fisch und Milch geprüft werden.

2 Schrifttum

2.1 Charakterisierung der Tetracycline

2.1.1 Chemie

Das erste, 1945 von DUGGAR (1948) aus der Kulturlösung von *Streptomyces aureofaciens* isolierte und 1948 in die Therapie eingeführte Tetracyclin war das Chlortetracyclin. Nach NELSON und LEVY (2011) und dem Kommentar zum DAB 10 folgten dem damals noch unter dem Namen „Aureomycin“ bekannten Antibiotikum 1949 das Oxytetracyclin und dann 1953 das Tetracyclin. Dieses letztere stellt den eigentlichen Grundkörper der nach ihm benannten Antibiotikagruppe dar. Wie in Abbildung 1 gezeigt, zeichnet sich das Grundgerüst durch ein Tetracen- (Naphthacen) Ringsystem aus, vier linear kondensierten Cyclohexanringen (BEYER und WALTER, 1981; ROTH, 1997; NELSON und LEVY, 2011). Die charakteristische Anordnung von Doppelbindungen erzeugt zwei chromophore Bereiche, A sowie BCD. Dies bedingt die gelbe Farbe der Substanz (DÜRCKHEIMER, 1975). Die verschiedenen Tetracycline, synthetisch hergestellte wie auch natürlich isolierte, unterscheiden sich lediglich, wie in Abbildung 1 dargestellt, durch die Substituenten R₁ bis R₅. Nach ROTH (1997) erklärt die Vielzahl der funktionellen Gruppen und deren räumliche Anordnung die Polyfunktionalität der Tetracycline. Zusammenfassend sind sie gelbe, kristalline, geruchlose, bitter schmeckende, lichtempfindliche Verbindungen, die aufgrund der sauren Gruppen und des basischen Dimethylamino-Rests amphotere Eigenschaften besitzen (ROTH, 1997; ARZNEIBUCH-KOMMENTAR, 2015).

In Substanz lassen sich die Tetracycline bei trockener und lichtgeschützter Lagerung ohne Zersetzung aufbewahren (ROTH, 1997; ARZNEIBUCH-KOMMENTAR, 2015). Die Wasserlöslichkeit hängt vom pH-Wert ab, ist im Allgemeinen aber gering. Hydrochloride zeigen hier ein besseres Löslichkeitsverhalten (ARZNEIBUCH-KOMMENTAR, 2015).

In Lösung unterliegen sie laut DÜRCKHEIMER (1975) verschiedenen Abbau- und Umwandlungsreaktionen. Sie spalten bei pH-Werten ≤ 2 unter Aromatisierung leicht Wasser ab und bilden sogenannte Anhydrotetracycline (Ausnahme: Oxytetracyclin bildet die epimeren α - und β -Apooxytetracycline). In leicht sauren, wie auch in basischen Lösungen neigen Tetracycline zu Isomerie (DÜRCKHEIMER, 1975; ROTH, 1997).

OTHERSEN et al. (2003) konnten zeigen, dass sich ein einziges Tetracyclin-Molekül in wässriger Lösung in 26 unterschiedliche tautomere Isoformen differenzieren kann. Dabei geht eine Konformationsänderung hin zu Epitetracyclinen mit dem Verlust der antibiotischen Wirksamkeit einher (NELSON und LEVY, 2011), diese beträgt laut ARZNEIBUCH-KOMMENTAR (2015) nur noch etwa 1,5% derjenigen des Tetracyclins, was vor allem bei Dauerinfusionslösungen beachtet werden muss (PLUMB, 2008).

Tetracycline zeigen eine große Tendenz zur Komplexbildung mit Anionen (z.B. Phosphat, Citrat), Neutralstoffen (z.B. Coffein, Harnstoff), Biopolymeren (z.B. Albumin, Lipoproteine, Globuline) und vor allem mehrwertigen Metallkationen (z.B. Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) (DÜRCKHEIMER, 1975; ROTH, 1997). Diese Eigenschaft ist für die antibiotische Wirksamkeit, die Pharmakokinetik (CHOPRA und ROBERTS, 2001) sowie für Nachweisverfahren von Tetracyclinen von wesentlicher Bedeutung.

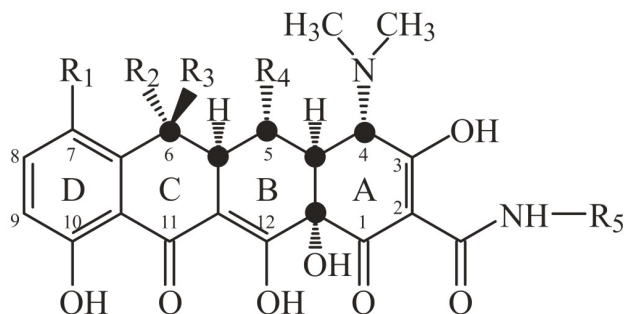



Abbildung 1: Struktur einiger Tetracyclinderivate mit Kennzeichnung der bei entsprechender Substitution entstehenden Chiralitätszentren (*) (in Anlehnung an ROTH, 1997)

Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tetracyclin	H	CH ₃	OH	H	H
Chlortetracyclin	Cl	CH ₃	OH	H	H
Oxytetracyclin	H	CH ₃	OH	OH	H
Demeclocyclin	Cl	H	OH	H	H
Doxycyclin	H	CH ₃	H	OH	H
Minocyclin	N(CH ₃) ₂	H	H	H	H
Rolitetracyclin	H	CH ₃	OH	H	CH ₂ -N 

2.1.2 Pharmakologie

Tetracycline besitzen bakteriostatische Wirkung (CHOPRA, 1985; NELSON und LEVY, 2011). Die Aufnahme durch die äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien hindurch in den periplasmatischen Raum erfolgt als positiv geladener Metallchelatkomplex. Diese passive Diffusion erfolgt mittels Porinproteinen (SCHNAPPINGER und HILLEN, 1996). Hier akkumulieren sie, bevor sie, energie- und pH-Wert-abhängig, in das Cytoplasma weitertransportiert werden (SCHNAPPINGER und HILLEN, 1996; ROBERTS, 2003).

Dort angekommen, unterdrücken Tetracycline die bakterielle Proteinbiosynthese, indem sie in ihrer aktiven Form als Mg-Chelatkomplex an die 30 S-Untereinheit der Ribosomen binden und somit die Interaktion der Aminoacyl-t-RNA (= mit Aminosäure beladene t-RNA) mit der Akzeptorregion des Ribosoms verhindern (SCHNAPPINGER und HILLEN, 1996; CHOPRA und ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; NELSON und LEVY, 2011). Die größere Affinität, an prokaryotische ribosomale Untereinheiten zu binden, erklärt die recht selektive antimikrobielle Eigenschaft der Tetracycline und die sehr geringen Auswirkungen auf menschliche Ribosomen (ROBERTS, 2003). Nicht alle Tetracycline interagieren jedoch in gleicher Weise mit bakteriellen Ribosomen. Ihre inhibitorischen Fähigkeiten sind qualitativ und quantitativ unterschiedlich, wobei nach NELSON und LEVY (2011) Minocyclin der potenteste und Tetracyclin der am wenigsten potente Vertreter zu sein scheint.

Nach CHOPRA und ROBERTS (2001) und NELSON und LEVY (2011) werden Tetracycline in 3 „Generationen“, abhängig ihres Entwicklungszeitpunktes, unterteilt. Die Einteilung nach AGWUH und MACGOWAN (2006) erfolgt dagegen in Abhängigkeit ihrer pharmakokinetischen und antibakteriellen Eigenschaften. Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin und Rolitetracyclin sind „Gruppe 1“ zuzuordnen. Abgesehen von Rolitetracyclin können alle anderen Vertreter oral verabreicht werden. Gruppe 2 zeichnet sich durch eine stärkere Lipophilie aus. Hierzu zählen Doxycyclin und Minocyclin (AGWUH und MACGOWAN, 2006). Der Gruppe 3 werden die noch in der Entwicklung befindlichen Tetracycline zugeordnet.

2.1.3 Einsatzgebiete und Indikationen

Aufgrund ihres weiten Wirkungsspektrums werden Tetracycline zu den „Breitspektrum-Antibiotika“ gezählt (CHOPRA et al., 1981; OKA et al., 2000; MATHERS et al., 2011; NELSON und LEVY, 2011; HOFACRE et al., 2013). Ihre antibakterielle Wirksamkeit richtet sich gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien inklusive Anaerobier (CHOPRA et al., 1981), Spirochäten, Rickettsien, Chlamydien und Mykoplasmen (DÜRCKHEIMER, 1975; CHOPRA und ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; PLUMB, 2008; NELSON und LEVY, 2011). Aufgrund der umfangreichen Anwendungsmöglichkeiten umfassen nach Angaben von CHOPRA und ROBERTS (2001)

und DAGHRIR und DROGUI (2013) die Einsatzgebiete der Tetracycline die Verwendung in der Humanmedizin, der Veterinärmedizin, wie den Gebrauch im Rahmen des Pflanzenbaus.

2.1.3.1 Humanmedizin

Aufgrund der immer häufiger auftretenden Resistenzen sind Tetracycline, abgesehen von der Behandlung intrazellulärer Infektionen, nicht mehr als Mittel der Wahl anzusehen (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1997; CHOPRA und ROBERTS, 2001).

Auf dem deutschen Markt steht laut ROTE LISTE (2007) lediglich ein zugelassenes Fertigarzneimittel mit Oxytetracyclin als Wirkstoff zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine Salbe zur Prophylaxe und Therapie bakteriell bedingter Hautinfektionen. Weitere Arzneimittel stehen mit Doxycyclin, Minocyclin und Tetracyclin als Wirkstoff in Form von Salben, Injektionslösung, zum überwiegenden Teil aber als Tabletten oder Kapseln zur Verfügung. Die Anwendungsgebiete umfassen die Behandlung von Acne vulgaris, Infektionen der Atemwege, des Urogenital- und Magendarmtraktes, der Borreliose, Brucellose sowie Psittakose (CHOPRA und ROBERTS, 2001; ROTE LISTE, 2007). CUNHA (1985) zählt weitere Einsatzgebiete, wie die Behandlung von Prostatitiden, auf. Zum Erhalt der Effektivität dieser wichtigen Antibiotikagruppe sollten Tetracycline stets selektiv eingesetzt werden. Bei bekannter Resistenz ist der Einsatz zu vermeiden.

Angaben über den Gebrauch von Tetracyclinen in der Humanmedizin sind aus vielen Regionen der Welt nicht zu erhalten (CHOPRA und ROBERTS, 2001). In Deutschland lag das ambulante Verordnungsvolumen von Tetracyclinen laut Statistik des BVL aus dem Jahr 2011, nach Penicillinen, an zweiter Stelle (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2014). Aufgrund der günstigen Kostenstruktur ist von weltweit stark verbreitetem Einsatz der Tetracycline, insbesondere in Entwicklungsländern, auszugehen (CHOPRA und ROBERTS, 2001).

Die in Deutschland im humanmedizinischen Bereich eingesetzten Antibiotika werden gemäß Germap 2012 (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2014) mit 700 bis 800 Tonnen jährlich angegeben. Damit liegen sie jedoch weit unter den

in der Veterinärmedizin eingesetzten Mengen von ca. 1.700 Tonnen, auf die im Weiteren detaillierter eingegangen werden soll.

2.1.3.2 Veterinärmedizin

Eine von der European Medicines Agency (EMA) veröffentlichte Studie zu Verkaufszahlen von antimikrobiellen Arzneimitteln in 26 EU-Staaten des Jahres 2012, zeigt den hohen Einsatz von antibiotischen Substanzen im Bereich lebensmittelliefernder Tiere. Von insgesamt 8.046 Tonnen wurden lediglich 0,8% im Heimtierbereich eingesetzt, der Rest von 99,2 % bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

Ein ähnliches Bild zeigt das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in seinem Bericht Germap 2012 auf. Demnach entfielen in Deutschland von den in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotikamengen 99,5% der antimikrobiellen Grundsubstanz auf Präparate, die für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen sind. Die ausschließlich für nicht-lebensmittelliefernde Tiere zugelassenen Präparate wurden lediglich mit circa 8 Tonnen beziffert (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2014).

Dabei wiesen Tetracycline in den Jahren 2011 und 2012 mit über 564 Tonnen die höchste Abgabemenge aller antimikrobiell wirksamen Substanzen auf, die an in Deutschland ansässige Tierärzte mit Hausapotheke abgegeben wurden (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2014). In einer Mitteilung vom 21.09.2016 informiert das BVL über die aktuellen Gesamtmengen der ausgereichten Antibiotika des Jahres 2015. Im Vergleich zum ersten Erfassungsjahr 2011 ergibt sich zwar eine Gesamtreduktion der Antibiotikamenge von 53%, weiterhin stehen Tetracycline mit 342 Tonnen aber wie im Vorjahr auf dem zweithöchsten Platz der Abgabemengen (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2016).

Diese Zahlen spiegeln so auch den Einsatz der Tetracycline auf europäischer Ebene wieder. Laut EMA entfielen von der Gesamtmenge der verkauften antimikrobiell

wirksamen Substanzen 37% auf Tetracycline (dies entspricht einer Menge von 2.943 Tonnen). Im Bereich lebensmittelliefernder Tiere werden überwiegend Vormischungen sowie Pulver und Lösungen zur oralen Verabreichung angegeben, die die vermehrte Behandlung ganzer Bestände vermuten lässt (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

Indikationen

Bei Rindern werden Tetracycline in geringem Umfang bei der Mastitis-Therapie (NAVRÁTILOVÁ et al., 2009), bei Infektionen des Urogenitaltraktes, der Atmungsorgane (BRIYNE et al., 2014), des Magen-Darm-Traktes (MATHERS et al., 2011) sowie der Dermatitis digitalis (KÜMPER, 2000) eingesetzt.

Im Bereich der Schweinehaltung werden Tetracycline zur Behandlung von Pneumonien (BRIYNE et al., 2014), verursacht durch *Pasteurella multocida* oder *Mycoplasma hyopneumoniae* sowie der Behandlung von Abszessen (MATHERS et al., 2011) eingesetzt.

Als die am häufigsten in der Geflügelproduktion eingesetzten Antibiotika werden Tetracycline vor allem bei Infektionen durch *E. coli*, *Mycoplasmen* spp., *Avibacterium paragallinarium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Rotlauf), *Pasteurella multocida* (Geflügelcholera) oder *Clostridium* spp. eingesetzt (MATHERS et al., 2011; HOFACRE et al., 2013).

In den USA und Kanada werden antimikrobiell wirksame Substanzen weiterhin als Wachstumsförderer eingesetzt (HOFACRE et al., 2013), insbesondere Chlor- und Oxytetracyclin (DAGHRIR und DROGUI, 2013). Diese Anwendung ist in Europa jedoch seit 2006 aufgrund der VO (EG) 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung komplett untersagt.

In Aquakulturen werden Tetracycline bei bakteriellen Infektionserkrankungen in Lachs-, Wels- und Hummerbeständen angewendet (CHOPRA und ROBERTS, 2001). Nach Angaben von RIGOS und TROISI (2005) und TOLMIEN (2011) findet vor allem Oxytetracyclin bei vielen bakteriell bedingten Infektionen als Mittel der Wahl Anwendung.

Laut HAMSCHER (2006) und HAMSCHER (2008) zählt es daher zu den weltweit am häufigsten in der Aquakultur eingesetzten Antibiotika. Zu den wichtigsten Indikationen zählen Erkrankungen durch *Flavobacterium spp.* (Erreger der Columnaris-Krankheit und der Kaltwasserkrankheit der Salmoniden), *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas spp.* (BENBROOK, 2002; NOGA, 2010), sowie *Yersinia ruckeri* (Erreger der Rotmaulseuche der Salmoniden) (HERNÁNDEZ SERRANO, 2005).

2.1.3.3 Pflanzenbau

Nach MCMANUS et al. (2002) ist Oxytetracyclin im Pflanzenbau das mit am weitesten verbreitete Antibiotikum. Der Einsatz erfolgt in der Obst- und Gemüseproduktion wie auch im Zierpflanzenbereich. Die Behandlung richtet sich gegen bakteriell bedingte Infektionserreger, vor allem gegen *Xanthomonas spp.* und *Mycoplasma*-Infektionen (CHOPRA und ROBERTS, 2001; PASTOR-NAVARRO et al., 2007), *Pseudomonas spp.* sowie den durch das Bakterium *Erwinia amylovora* hervorgerufenen Feuerbrand, welcher vor allem Rosengewächse befällt (ZELLER, 1992). Den Angaben von MCMANUS et al. (2002) zufolge entfällt in den USA eine Menge von 0,5% des Gesamtverbrauches an Antibiotika auf den Einsatz im Pflanzenbau. In Deutschland dagegen ist der Einsatz von Antibiotika im Pflanzenschutz generell verboten.

2.2 Bewertung durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA)

Als Grundlage für die Zulassung von Wirkstoffen zur Anwendung an lebensmittelliefernden Tieren erfolgte durch die EMA eine Bewertung von Oxy-, Chlor- und Tetracyclin im Rahmen des MRL-Verfahrens (EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA), 1996).

Laut EMA zeigte die toxikologische Bewertung der drei genannten Vertreter der Tetracycline eine geringe akute Giftigkeit. Der LD₅₀-Wert für Oxytetracyclin liegt laut EMA bei Mäusen zwischen 3.600 mg/kg Körpergewicht (KG) und 7.200 mg/kg KG, bei Tetracyclin und Chlortetracyclin zwischen 2.150 mg/kg KG und > 5.000 mg/kg KG. Die toxikologische Spanne der Tetracycline ist damit als sehr weit einzustufen, die akute

Toxizität ist dagegen gering. Jedoch wurden hepatotoxische Effekte in Ratten sowie skeletale Malformationen bei Hunden belegt. Die vorliegende Datenlage ermöglichte es der EMA, Oxytetracyclin als nicht teratogen einzustufen. Bei Tetracyclin und Chlortetracyclin konnte weder ein carcinogenes noch ein genotoxisches Potential nachgewiesen werden.

In einer klinischen Studie an humanen Probanden evaluierte die EMA die mikrobielle Auswirkung von Oxytetracyclin auf die Darmflora. Dabei konnten bei einer täglichen Aufnahme von 2 mg Oxytetracyclin pro Person keine Resistenzen von *Enterobacteriaceae* induziert werden. Unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 10 wurde deshalb für Oxytetracyclin eine erlaubte Tagesaufnahme (Acceptable Daily Intake, ADI) von bis zu 3 µg/kg KG errechnet. Dieser Wert wurde durch die WHO/FAO interpolierend als Grundlage zur Festsetzung von MRL-Werten auch für Tetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin übernommen.

Als Parameter in der Rückstandsanalytik von Lebensmitteln, wurde im Falle von Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin die Detektion des Markerrückstands in Höhe der „Summe der Muttersubstanz und ihren 4-Epimeren“ gefordert. Diese Forderung wurde zunächst in die VO (EWG) Nr. 2377/90 und der darauf folgenden VO (EU) 37/2010 der Kommission vom 22.12.2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs übernommen.

2.3 Rückstandsverhalten

Nach MITCHELL et al. (1998) führen alle Arten von Applikationsformen der Antibiotika (oral, per injectionem, intramammär, intrauterin, topisch) zu Rückständen in den aus den behandelten Tieren hergestellten Lebensmitteln, wie Milch, (Fisch-) Fleisch und Eier (JEONG und RHEE PAENG, 2012).

Da Tetracycline im aquatischen Milieu, insbesondere im Salzwasser, zur Bildung inaktiver Komplexe neigen, müssen in der Aquakultur bei der Verabreichung von Fütterungsarzneimitteln an Fische hohe Dosismengen appliziert werden. Nach Angaben

von BJÖRKLUND et al. (1990) beträgt dies 50-100 mg/kg Fisch pro Tag für 8-10 Tage. Da jedoch eine vollständige Aufnahme des Futters in den wenigsten Fällen zu erreichen ist, akkumulieren beachtliche Mengen der Arzneimittel auf dem Meeresboden. JACOBSEN und BERGLIND (1988) konnten in Ihrer Studie eine Halbwertszeit von Oxytetracyclin im Sediment von Fischfarmen von 10 Wochen ermitteln, BJÖRKLUND et al. (1990) einen Zeitraum von 9 bis 419 Tagen.

Die Neigung der Tetracycline zur Chelatbildung erschwert auch deren Nachweis. Eine vollständige Mobilisierung ist in der Analytik häufig nur schwer möglich. So beschreiben POMP und BÜNING-PFAUE (1996) die Problematik, Oxytetracyclin aus den Calciumhaltigen Gräten von Fischen zu quantifizieren. Erst durch Wiederholung der Extraktion konnten sie die analytische Verfügbarkeit verbessern.

Neben unerwünschten Wirkungen der Tetracycline (MARTINDALE, 1989; ROTE LISTE, 2007; PLUMB, 2008) treten sie auch gelegentlich als Auslöser allergischer Reaktionen in Erscheinung, die jedoch von BECKER (1976) und BALDO et al. (2001) im Verhältnis zu anderen Antibiotikaklassen als eher selten bezeichnet werden.

HAMSCHER (2006) weist weiterhin auf die Möglichkeiten des Transfers von Tetracyclinen aus belasteten Bodenproben in darauf kultivierte Mais- und Getreidepflanzen hin. Zwar seien die in den zugrundeliegenden Untersuchungen verwendeten Chlortetracyclinmengen vergleichsweise hoch gewesen, dennoch sollte die Relevanz dieser Ergebnisse im Rahmen möglicher Rückstandsuntersuchungen Berücksichtigung finden. Desweiteren verifizierte die Arbeitsgruppe in einer Studie die Möglichkeit des „run-off“ von Tetracyclinen durch ausgebrachte Wirtschaftsdünger in Oberflächengewässer und deren Sedimente (BAILEY et al., 2015).

2.4 Gesetzliche Grundlagen und Überwachung der Rückstandssituation

2.4.1 Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Gemäß der Grundlage jeder lebensmittelrechtlichen Beurteilung, dem LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch), ist es nach § 10 verboten, „vom Tier gewonnene Lebensmittel in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind.“

Das Inkrafttreten der VO 470/2009 (EG) „über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“ am 06.07.2009 führte zur Aufhebung der VO 2377/90 (EWG), zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG „zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel“ sowie zur Änderung der VO 726/2004/EG „zur Festlegung von Gemeinschaftsverfahren für die Genehmigung und Überwachung von Human- und Tierarzneimitteln und zur Errichtung einer Europäischen Arzneimittel-Agentur“.

Die neu in Kraft getretene VO (EU) 37/2010 „über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“ listet in der ersten Tabelle alphabetisch sortiert pharmakologisch wirksame Substanzen inklusive der von der Europäischen Arzneimittelagentur ermittelten oder nach dem Beschluß der Codex-Alimentarius-Kommission angegebenen Rückstandshöchstmengen (MRL, Maximum Residue Limit) auf (siehe auch Kapitel 2.2). Ebenfalls aufgeführt sind Stoffe ohne Rückstandshöchstmengen, da von ihnen keine gesundheitliche Gefahr ausgeht. Die zweite Tabelle enthält verbotene Substanzen, für die keine MRL-Werte vorliegen und deren Anwendung beim lebensmittelliefernden Tier aufgrund des hohen gesundheitlichen Risikos untersagt ist.

Eine zusammenfassende Übersicht über die in der VO (EU) Nr. 37/2010 Tabelle I gelisteten Vertreter der Tetracycline bietet Tabelle 1 inklusive Darstellung der Rückstandshöchstmengen für die jeweiligen Zielgewebe. In der VO wird zwar dem Nahrungsmittel Fisch kein eigener MRL-Wert zugewiesen, er wird jedoch eindeutig

Schrifttum

definiert als „Muskel-Rückstandshöchstmenge“ und ist somit bei Chlor-, Oxy- und Tetracyclin auf maximal 100 µg/kg festgesetzt.

Tabelle 1: Höchstmengen (Maximum Residue Limit, MRL) für Tetracycline in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nach VO (EU) Nr. 37/2010, Tabelle I

Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Markerrückstand	Tierart(en)	Rückstandshöchstmenge(n)	Zielgewebe	sonstige Vorschriften (gem. Art. 14 Abs. 7 der VO (EG) Nr. 470/2009)
Chlortetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	alle zur Lebensmittel-erzeugung genutzten Arten	100 µg/kg	Muskel	Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstands-höchstmenge-wert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmenge-werte für Leber und Nieren gelten nicht für Fisch.
			300 µg/kg	Leber	
			600 µg/kg	Nieren	
			100 µg/kg	Milch	
			200 µg/kg	Eier	
Doxycyclin	Doxycyclin	Rinder	100 µg/kg	Muskel	Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist
			300 µg/kg	Leber	
			600 µg/kg	Nieren	
		Schweine, Geflügel	100 µg/kg	Muskel	Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt ist
			300 µg/kg	Haut und Fett	
			600 µg/kg	Leber Nieren	
Oxytetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	alle zur Lebensmittel-erzeugung genutzten Arten	100 µg/kg	Muskel	Für Fisch beträgt der Muskel- Rückstandshöchstmenge-werte "Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen". Die Rückstandshöchstmenge-werte für Fett, Leber und Nieren gelten nicht für Fisch.
			300 µg/kg	Leber	
			600 µg/kg	Nieren	
			100 µg/kg	Milch	
			200 µg/kg	Eier	
Tetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	alle zur Lebensmittel-erzeugung genutzten Arten	100 µg/kg	Muskel	Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstands-höchstmenge-wert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmenge-werte für Leber und Nieren gelten nicht für Fisch.
			300 µg/kg	Leber	
			600 µg/kg	Nieren	
			100 µg/kg	Milch	
			200 µg/kg	Eier	

2.4.2 Nationaler Rückstandskontrollplan und Importwarenuntersuchung

Seit 1989 werden Lebensmittel tierischen Ursprungs im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans (NRKP) untersucht. Grundlage sind EU-einheitliche Kriterien, entsprechend der Entscheidung der Kommission 97/747/EG und der Richtlinie 96/23/EG des Rates. Ziel ist es, die illegale Anwendung verbotener oder nicht zugelassener Stoffe zu detektieren, den vorschriftsmäßigen Einsatz von zugelassenen Tierarzneimitteln zu kontrollieren und die Belastung mit Umweltkontaminanten, wie beispielsweise Schwermetallen, zu erfassen sowie wissenschaftliche Einstufungen zu Rückständen zu verifizieren. Im Jahr 2013 wurden in Deutschland insgesamt 57.679 Proben genommen, die hinsichtlich 1.158 unterschiedlicher Stoffe geprüft wurden. Dabei wurden 368 Proben ermittelt, die Rückstände in unzulässiger Höhe, sogenannte Rückstandshöchstmengenüberschreitungen, aufwiesen. Dazu kommen im gleichen Jahr 308.146 Tiere, die mittels des Dreiplattentests, einer Screeningmethode auf Hemmstoffe, untersucht wurden. Davon waren 726 Proben positiv, von denen in 34,15% der Fälle Tetracycline als Hemmstoff identifiziert werden konnten (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2015). Den gehäuftem Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln tierischer Herkunft bestätigt auch das Bayerische Landesuntersuchungsamt (LGL). In einer zwischen 2008 und 2012 durchgeführten Studie dieser Einrichtung wurden Tetracyclinrückstände in Geflügel- und Schweinefleisch nachgewiesen. Dies „korreliert mit der Situation auf dem Tierarzneimittelmarkt in Deutschland, an dem Tetracycline einen hohen Marktanteil haben.“ (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (LGL), 2013)

Erzeugnisse aus Nicht-EU-Staaten werden bundeseinheitlich seit 2004 nach dem Einfuhrückstandskontrollplan und seit 2010 mit erweitertem Untersuchungsspektrum nach dem Einfuhrüberwachungsplan (EÜP) untersucht. Probenahmen nach Anhang II Abs. 1 der VO (EG) Nr. 136/2004 erfolgen stichprobenartig an den Grenzkontrollstellen und werden in den jeweiligen Länderbehörden untersucht. Im Jahr 2013 wurden 1020 Planproben von tierischen Erzeugnissen in 15.256 Untersuchungen bezüglich 301 unterschiedlicher Stoffe untersucht (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2015b). Beispielsweise war im Jahr 2013 besonders auffällig, dass in allen Hemmstoff-positiven Honigproben der Nachweis von Tetracyclinen

gelang (5 von insgesamt 81 untersuchten Honigproben) (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2015b).

Die von den Untersuchungseinrichtungen der Länder aus den analysierten Proben gewonnenen Daten werden ausgewertet und jährlich an das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) gemeldet. Das BVL wiederum hat an die Europäische Kommission Bericht zu erstatten (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2016a).

2.4.3 Europäisches Schnellwarnsystem

Die Entscheidung der Kommission 2005/34/EG legt für die Untersuchung nach bestimmten Rückständen von aus Drittländern eingeführten Erzeugnissen tierischen Ursprungs einheitliche Normen fest. Bei Verdachtsfällen werden Waren bis zur Vorlage des Untersuchungsergebnisses beschlagnahmt, beanstandete Erzeugnisse werden zurückgewiesen oder vernichtet, bereits importierte Güter werden zurückgerufen. Im Falle einer Zurückweisung stellt das Europäische Schnellwarnsystem sicher, dass die Waren nicht wieder über eine andere Grenzkontrollstelle in die EU gelangen (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2016b).

Die VO (EG) Nr. 178/2002 schuf die gesetzliche Grundlage für zwei Europäische Schnellwarnsysteme: für Lebensmittel und Futtermittel (RASFF, Rapid Alert System for Food and Feed) sowie für Bedarfsgegenstände (RAPEX, Rapid Exchange of Information System). Der schnelle Informationsaustausch dient der Vermeidung von potentiellen Umweltschäden sowie Gesundheitsrisiken für Mensch und Tier durch Lebensmittel oder Futtermittel, die im Binnenland gehandelt werden (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2016b).

Die Schnellwarnungen des RASFF der Jahre 2011-2014 im Lebensmittelbereich umfassten im Bereich Tetracycline ausschließlich Meldungen zu den vier, zur Anwendung an lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Vertretern aus dieser Klasse (Tetracyclin, Chlor-, Oxytetracyclin und Doxycyclin). Rückstände wurden in Fischereiprodukten (hierbei überwiegend in Shrimps und Garnelen), Geflügel-, Schwein- und Rindfleisch

sowie einmalig in Honig nachgewiesen (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2016c).

2.5 Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln

Bei der Analyse von Arzneimittelrückständen in Lebensmitteln wird zwischen Screening-Methoden und Bestätigungs- bzw. Referenzverfahren unterschieden (HAMSCHER, 2003).

Screening-Methoden müssen relativ einfache Probenvorbereitungen mit geringem Arbeitsaufwand und schnelle und kostengünstige Reihenuntersuchungen ermöglichen. Nachteile stellen die zum Teil unsichere Identifizierung einzelner Substanzen und deren Quantifizierung dar, sowie das Auftreten falsch positiver beziehungsweise negativer Ergebnisse (HAMSCHER, 2003).

SUHREN und HEESCHEN (1996) definieren einen „idealen“ Screening-Test, nachdem dieser unter Berücksichtigung von (gesetzlichen) Erfordernissen (MRL) ein möglichst breites Spektrum antimikrobieller Substanzen detektieren und schnelle Ergebnisse liefern sollte, zudem sollte er einfach durchzuführen, leicht erlernbar, günstig und für Massenuntersuchungen geeignet sein. Bestenfalls zeigt ein Test geringe Interferenzen mit Probenmatrices und ermöglicht eine Standardisierung zwischen Chargen und Laboren.

Diese Anforderungen an Schnelltests wurden von SUHREN und HEESCHEN (1996) zwar im Hinblick auf die mikrobiologischen Nachweisverfahren genannt, treffen jedoch ebenso auf andere Screening-Methoden zu.

Konkrete Aussagen über den eindeutigen Nachweis einer einzelnen Substanz und deren genaue Konzentration sind dagegen nur über sehr arbeitsaufwendige und instrumentell anspruchsvolle Bestätigungs- bzw. Referenzverfahren möglich (HAMSCHER, 2003; ZHAO et al., 2008).

Zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs werden verschiedene Nachweisverfahren, Screening- wie auch Referenzmethoden, beschrieben, die auf unterschiedlichen Eigenschaften der Verfahren und der nachzuweisenden

Tetracycline beruhen. Sie können in mikrobiologische, chemisch-physikalische und immunologische Nachweisverfahren eingeteilt werden.

2.5.1 Mikrobiologische Nachweisverfahren

Die sogenannten Hemmstofftests zählen zu den mikrobiologischen Screening-Methoden (HAMSCHEER, 2003).

Das Prinzip dieser Testsysteme beruht auf der Diffusion des eventuell vorhandenen Antibiotika-Rückstandes aus der Probenmatrix in das Nährmedium. Der Wirkstoff hemmt das Wachstum des definierten Testkeimes im Medium (TERPLAN und ZAADHOF, 1967). Abhängig vom Testdesign induziert die Anwesenheit dieses Hemmstoffes eine sogenannte Hemmzone oder bewirkt durch Änderung eines beigefügten Indikators einen Farbumschlag des Mediums (MITCHELL et al., 1998; NEAVES, 1999).

Die größten Nachteile sind nach MITCHELL et al. (1998) die fehlende Spezifität dieser Testformate, der rein qualitative Nachweis einer Substanz, die sehr begrenzten Nachweisgrenzen, die zeitintensive Durchführung (2,5 bis 18 Stunden bis zur Vorlage eines Testergebnisses) sowie durch natürlich vorkommende Wachstumsinhibitoren, die Möglichkeit falsch-positiver Testergebnisse. Vorteile liegen dagegen in der Fähigkeit, alle biologisch aktiven und inhibitorisch wirkenden Substanzen zu detektieren (STEAD und STARK, 2011), desweiteren in der kostengünstigen Durchführung, im möglichen hohen Probenumsatz, in der einfachen Handhabung und im weiten Untersuchungsspektrum (MITCHELL et al., 1998).

Gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASUV) nach § 64 LFGB finden nach wie vor verschiedene Agar-Diffusions-Verfahren bei der Untersuchung von Lebensmitteln Anwendung. Eine Übersicht über kommerziell erhältliche Testformate sowie deren Nachweisempfindlichkeiten gegenüber Tetracyclinen ist in Tabelle 2 dargestellt.

2.5.2 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

Chromatographische Verfahren

In der Rückstandsanalytik werden chromatographische Nachweisverfahren als Bestätigungs- bzw. Referenzmethoden angewandt (HEESCHEN und SUHREN, 1996; HAMSCHER, 2003), da diese genauere Ergebnisse auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen liefern (MITCHELL et al., 1998) und häufig ein Miterfassen von biologisch inaktiven Metaboliten ermöglichen (TARBIN et al., 2011). Nachteile dieser Verfahren stellen der hohe Personal-, Zeit-, Geräte- und Kostenaufwand dar, sowie die Bedingung eines geschulten Personals, was die routinemäßige Anwendung limitiert (MITCHELL et al., 1998; TOLMIEN, 2011). Aus diesen Gründen sind sie nur bedingt für einen routinemäßigen Einsatz und zu Screeningzwecken zum Nachweis von Tetracyclinen geeignet (LANG et al., 1992; ZHANG et al., 2007).

Allen chromatographischen Methoden gemein ist die physikalisch-chemische Trennung von Substanzgemischen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase durch unterschiedliche Verteilungsmuster der einzelnen Komponenten (HAMSCHER, 2003). Nach MATISSEK et al. (2014) erfolgt eine Einteilung der verschiedenen Verfahren nach Aggregatzuständen der unterschiedlichen Phasen (flüssig (liquid), fest (solid) und gasförmig (gaseous)), sowie nach dem Aufbau der Trennstrecke (Dünnschichtchromatographie, Säulenchromatographie, Gaschromatographie).

Beruhend auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Tetracycline wurden in den mehr als 20 vergangenen Jahren eine Vielzahl von chromatographischen Analysemethoden beschrieben, wie Übersichtsarbeiten von MARZO und DAL BO (1998), SCHENCK und CALLERY (1998), OKA et al. (2000), ANDERSON et al. (2005), ÖNAL (2011), TARBIN et al. (2011), KAHSAY et al. (2014) zeigen.

2.5.3 Immunologische Nachweisverfahren

Grundlage immunologischer Nachweisverfahren stellen spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen dar (HAMSCHER, 2003).

In den verschiedenen Testaufbauten werden radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), lumineszierende beziehungsweise fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay, FIA) (EKINS, 1985; JACKSON und EKINS, 1986) oder Enzyme (Enzyme immunoassay, EIA) als Marker genutzt, die den entsprechenden Testsystemen ihre Bezeichnung verleihen (WISDOM, 1976; NGO und LENHOFF, 1981; NEWSOME, 1986; LEQUIN, 2005). Hierbei stellen EIAs die am häufigsten verwendete Methode zum Nachweis von Rückständen in Lebensmitteln dar (PASTOR-NAVARRO et al., 2009). Als immunochemische Nachweisverfahren vereinen sie nach CLIQUET et al. (2001) die Vorteile der hohen Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit sowie einfachen Handhabung und der Kosteneffektivität bei der Anwendung innerhalb der Routinediagnostik (CHÁFER-PERICÁS et al., 2010).

Enzyme immunoassay (EIA)

Eine Differenzierung der verschieden aufgebauten Systeme erfolgt nach MÄRTLBAUER (1993) anhand der nachfolgend kurz beschriebenen Charakteristika.

Zum einen wird zwischen homogenen (separationsfreien) und heterogenen (mit Separationsschritt) Tests unterschieden (WISDOM, 1976; NGO und LENHOFF, 1981). Eine weitere Unterscheidung der EIAs erfolgt in kompetitive und nicht-kompetitive Testsysteme. Im Gegensatz zu dem nicht-kompetitiven Testdesign, bei dem markierte Antikörper im Überschuss zum Antigen vorliegen, konkurrieren bei kompetitiven EIAs die markierten und unmarkierten Antigene um die begrenzte Anzahl von Antikörpern (EKINS, 1989).

Weitere Unterteilungen bezüglich verschiedener Anordnungen der beteiligten Reagenten, unterschiedlicher Reihenfolge der Reagenzienzugabe sowie unterschiedlicher Marker zur Sichtbarmachung der erfolgten Reaktionen werden durch VAN WEEMEN und SCHUURS (1971), WISDOM (1976), SCHUURS und VAN WEEMEN (1980), NGO und LENHOFF

(1981), OELLERICH (1984), EKINS (1985), JACKSON und EKINS (1986), LEQUIN (2005) beschrieben.

Nach NEWSOME (1986) lassen sich mittels enzymimmunologischer Verfahren unterschiedlichste niedermolekulare Substanzen, wie Mykotoxine, Pestizide, Kontaminanten, (pflanzliche) Hormone oder auch Arzneimittelrückstände nachweisen.

Der ursprünglich von ENGVALL und PERLMANN (1971) geprägte Begriff „ELISA“ (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurde in der Zwischenzeit von dem etwas allgemeineren Begriff des EIA (Enzyme immunoassay) abgelöst.

Kompetitive EIAs

Die Testanordnung lässt sich in direkte und indirekte Assays untergliedern.

Bei der **direkten** Testanordnung wird der Primärantikörper an der Festphase (Mikrotiterplatte) immobilisiert. Hinzugefügtes freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (RITTENBURG, 1990). Bei der Doppelantikörpertechnik (Double Antibody Solid Phase, DASP) erfolgt die Bindung über einen zweiten Antikörper (tierartspezifisches Anti-Immunglobulin) (OELLERICH, 1984). Beim **indirekt** kompetitiven EIA ist das Antigen-Protein-Konjugat an die Festphase gebunden. Freies Antigen und spezifische Antikörper werden hinzugegeben. In diesem Testaufbau konkurrieren somit das gebundene und das hinzupipettierte Antigen um die begrenzte Anzahl der freien Bindungsstellen an den Antikörpern.

Bei allen vorgenannten Verfahren wird zwischen homologer und heterologer Kombination von Antiserum (Antikörpern) und dem Antigen-Protein-Konjugat unterschieden. Im Falle einer homologen Kombination wird das gleiche Hapten (bzw. Antigen) für die Immunogensynthese wie auch zur Herstellung des enzymmarkierten Antigens benutzt. Daraus ergibt sich, dass die antigene Determinante am Immunogen und am Enzym identisch sind. Bei der heterologen Kombination wird entweder ein unterschiedliches Hapten genutzt, ein anderes Derivatisierungsreagenz (heterologe Brücke) oder eine andere Position am Molekül (heterologe Seite) zur Kopplung verwendet (MÄRTLBAUER, 1993).

Da sich immunchemische Verfahren durch ihre Empfindlichkeit und Einfachheit der Arbeitsschritte auszeichnen, sich dadurch kosteneffizient einsetzen lassen, eignen sie sich

vornehmlich zur Untersuchung größerer Probenaufkommen im Rahmen von Screening-Tests (NEWSOME, 1986; PASTOR-NAVARRO et al., 2009; LE et al., 2011; GAO et al., 2013).

Seit Erstbeschreibung der Entwicklung eines EIAs zum Nachweis von Tetracyclin durch LANG (1991) und MÄRTLBAUER (1993) ist eine Vielzahl an Tests beschrieben und entwickelt worden und zum Teil als kommerziell erhältliche Testkits (BIOO SCIENTIFIC CORP. (2011), IDEXX, R-BIOPHARM AG) verfügbar.

Den Veröffentlichungen zufolge wurden unterschiedliche Protokolle zur Herstellung von Immunogenen und Beschichtungsantigenen angewandt. Im Folgenden wird näher auf die Entwicklung und Charakteristika der entwickelten EIAs zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln eingegangen, eine Übersicht gibt Tabelle 10 (s. Anhang) wieder.

LANG et al. (1992) beschreiben erstmalig die erfolgreiche Herstellung von polyklonalen Tetracyclin-Antikörpern und anschließender Entwicklung eines EIAs zum Nachweis von Tetracyclinen in Milch und Urin (LANG, 1991). In Kompetitionsversuchen stellten sie starke Kreuzreaktionen zwischen 33% und 114% mit Chlor-, Roli-, Mino-, und Demeclocyclin fest. Aufgrund mangelnder Sensitivität der generierten Antikörper gegenüber Oxytetracyclin forderten sie zum umfassenden Nachweis von Tetracyclinen, gegebenenfalls im Rahmen eines „Multi-Residue-Systems“, bereits 1992 die Herstellung von Antikörpern gegen Oxytetracyclin.

EVEREST et al. (1994) impften Schafe mit an Ovalbumin gekoppeltem Tetracyclin und validierten mittels eines direkten Testaufbaus ihren Test an der Probenmatrix Milch und Niere. Das Generieren von Standardkurven für Chlor- und Oxytetracyclin gelang zwar, doch zeigte der Test keine Kreuzreaktivität mit weiteren Tetracyclinderivaten. Als Kopplungsmethode wurde zur Herstellung des Immunogens, wie auch des Tetracyclin-HRP-Konjugates die Carbodiimid-Methode (EDC-Methode) gewählt. Für Chlor-, Oxy- sowie Tetracyclin konnten in den Matrices Niere und Milch Nachweisgrenzen in Höhe von 50 µg/kg und 15 µg/l erreicht werden.

In der Absicht, möglichst heterologe Tetracyclinderivate zu erhalten, beschreiben PASTOR-NAVARRO et al. (2007) erstmalig die Herstellung von Tetracyclin-Haptenen,

und zwar von Tetracyclin, Oxy- und Chlortetracyclin. Diese setzten sie nach Kopplung mittels aktiver Estermethode an bovines Serumalbumin (BSA) und keyhole limpet hemocyanin (KLH) als Immunogen zur Antikörpergewinnung in Kaninchen ein. Als potentielle Beschichtungsantigene wurden via Mannich-Reaktion alle drei Tetracycline an BSA, KLH und Ovalbumin (OVA) gekoppelt. Optimiert wurde der Test in der Kombination von anti-OTC-KLH-Antikörpern mit dem Festphasenantigen TC-OVA. In diesem indirekten Aufbau wurde der Test an Honig validiert und erreichte eine Nachweisgrenze von 0,4 µg/kg für Tetracyclin. Kreuzreaktionen wurden mit Rolitetetracyclin (91%), Oxytetracyclin (30%) sowie auch mit einigen Tetracyclinderivaten (Anhydrotetracyclin (1,4%)) nachgewiesen. Basierend auf der hier dargestellten Kombination von Festphasenantigen (TC-OVA) und gewonnenen Antikörpern (anti-OTC-KLH-Antikörper) wurde in einer späteren Veröffentlichung (CHÁFER-PERICÁS et al., 2010) der Test zunächst in Versuchen bezüglich der Inkubationszeiten, der Absättigungslösung, dem pH-Wert und der Konzentrationen der Wasch- und Pufferlösung optimiert. Somit wurde bei einem pH-Wert von 8,5, einer Kompetitionszeit von 45 min, sowie einer Inkubationszeit von 60 min und 10 mmol/l PBS-Tween 20-Lösung und einer Absättigungslösung mit 1,5% Hämoglobin für die Probenmatrix Fisch eine Nachweisgrenze von 16 µg/kg OTC erreicht. Zur Bestätigung wurde eine HPLC-Untersuchung angeschlossen, deren Nachweisgrenze mit 13 µg/kg vergleichbar war. Der ebenfalls entwickelte time-resolved fluorescence immunoassay (TR-FIA) lieferte eine Nachweisgrenze von 0,08 µg/kg OTC in Fisch.

ZHANG et al. (2007) koppelten zur Produktion von Immunogenen Tetracyclin mittels drei verschiedener Kopplungsmethoden an BSA. Es wurden Protokolle unter Einsatz von Tolidin und Carbonyldiimidazol (CDI) eingesetzt. Weiterhin wurde durch die aktive Estermethode Tetracyclin zunächst an p-Aminobenzoesäure (PABA) und im folgenden Schritt mittels Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid an kationisiertes BSA gekoppelt. Die hier beschriebenen Proteinkonjugate wurden zur Gewinnung polyklonaler Antikörper in Kaninchen eingesetzt. Die Herstellung der Beschichtungsantigene erfolgte analog anhand derselben Methoden, wobei Tetracyclin an das Protein OVA gekoppelt wurde. In den sich anschließenden Versuchen wurden die drei verschiedenen Antiseren in Kombination mit den drei Beschichtungsantigenen eingesetzt. Zur weiteren Testentwicklung wurde die Kombination des Antiserums TC-BSA (CDI) mit dem Beschichtungsantigen TC-PABA-cOVA gewählt. Hier zeigte der Test beim Einsatz in

Milch (künstlich kontaminiert in Dotierungen zwischen 0,2 µg/ml bis 2,0 µg/ml) bei einer Verdünnung von 1:20 Wiederfindungsraten zwischen 74% und 116%.

JEON et al. (2008) entwickelten mit Hilfe kommerzieller anti-Tetracyclin-Antikörper einen Biotin-Avidin-vermittelten EIA, den die Arbeitsgruppe zunächst erfolgreich an Milch validierte und später an Honig (JEON und RHEE PAENG, 2008). In beiden Fällen nutzten sie, ohne Angabe einer Kopplungstechnik, TC-OVA als Beschichtungsantigen und erreichten nach einem Wechsel des kommerziellen Antikörpers eine Nachweisgrenze von 0,048 µg/l in Milch und 0,19 µg/kg in Honig.

ZHAO et al. (2008) entwickelten einen Chlortetracyclin-EIA und generierten zunächst mithilfe von Natriumchloracetat ein Hapten. Das entstandene Carboxymethyl-CT koppelten sie via EDC-Methode an BSA. Das so hergestellte Konjugat wurde zur Immunisierung von Kaninchen genutzt. Mittels derselben Methode erfolgte die Kopplung von Carboxymethyl-CT an OVA, welches als Festphasenantigen diente. Der Test zeigte, abgesehen von einer geringen Kreuzreaktivität gegenüber Tetracyclin (3%) eine hohe Spezifität und wurde an Fleisch, Innereien sowie Fisch getestet und erreichte Nachweisgrenzen zwischen 1,18 µg/kg und 1,72 µg/kg.

BURKIN und GALVIDIS (2009) entwickelten einen indirekt kompetitiven EIA, indem sie zunächst sieben Vertreter der Tetracycline mittels Mannich-Kondensation (Formaldehyd-Methode) an Gelatine und mittels reduktiver Alkylierung (Perjodatkopplung) an humanes Transferrin koppelten. Ebenfalls wurden die Kopplungsmethoden der Glutardialdehydmethodemethode sowie der aktiven Estermethode genutzt. In einer Schachbrett-titration wurden alle Konjugate gegen sieben Tetracycline austitriert. Als Festphasenantigen stellte sich das durch Perjodatkopplung hergestellte CT-Transferrin als das geeignetste heraus. Es konnte in Kombination mit Anti-TC-BSA (FA)-Antikörpern eine Nachweisgrenze von Tetracyclin in Höhe von 0,1 µg/l erreichen. Aufgrund fehlender Angaben zu weiteren Untersuchungen in Lebensmitteln stehen folgende Beurteilungen für diese komplexen Matrices noch aus.

LE et al. (2009) produzierten erstmalig einen Immunoassay, basierend auf polyklonalen anti-Doxycyclin-Antikörpern durch Herstellung des Immunogens Doxy-PABA-BSA. Zunächst wurde PABA an Doxycyclin gebunden, um im anschließenden Schritt durch die

„Mixed-Anhydrid-Methode“ an BSA gekoppelt zu werden. Die Produktion der Antikörper erfolgte in immunisierten Kaninchen. Die Konjugation des Beschichtungsantigens Doxy-PABA-OVA erfolgte analog. Optimierungsversuche ergaben eine Inkubationszeit des Antiserums von 15 Minuten und eine Verdünnung von 1:32.000. Die Antikörper zeigten lediglich mit Oxytetracyclin (11%), TC (4%), Chlortetracyclin (<2%) Kreuzreaktionen. Die Validierung des Testaufbaus wurde an Muskelfleisch und Leber durchgeführt und ergab eine Nachweisgrenze von 1,96 µg/l sowie Wiederfindungen zwischen 80% und 95% der mit 50 µg/kg – 600 µg/kg dotierten Proben. In einer folgenden Veröffentlichung (LE et al., 2012b) stellte die Arbeitsgruppe einen simultan hergestellten EIA vor, lediglich basierend auf monoklonalen Antikörpern. Die Nachweisgrenze konnte zwar in diesem Test deutlich auf 0,14 µg/l reduziert werden, jedoch ohne Angabe, diese auch in einer Probenmatrix wie Fleisch ermitteln und bestätigen zu können. Wiederfindungsraten wurden mit 85-89% angegeben und in Leber-, Muskel- und Eiprobe ermittelt.

Weiterhin stellte die Arbeitsgruppe (LE et al., 2011) das Immunogen CT-BSA her, generierte dieses Mal monoklonale Antikörper und setzte diese in einem indirekten EIA zum Nachweis von Chlortetracyclin in Geflügelfleisch und Leber ein. Als Beschichtungsantigen verwendeten sie CT-OVA, wie auch das Immunogen durch EDC gekoppelt, und erreichten mit ihrem hoch spezifischen Test auf Chlortetracyclin Nachweisgrenzen von 0,06 µg/kg und 0,07 µg/kg. Angaben zu dem ebenfalls von der Arbeitsgruppe entwickelten Lateral flow test in Teststreifenformat finden sich in Kapitel 2.5.4.

In LE et al. (2012a) entwickelte die Gruppe einen indirekt kompetitiven OTC-EIA, ebenfalls basierend auf monoklonalen Antikörpern. Als Immunogen wurde OTC-BSA, als Festphasenantigen OTC-OVA verwendet. Der Test wurde an Geflügelfleisch und –leber validiert, zeigte sich hoch spezifisch gegenüber Oxytetracyclin und 4-epi-Oxytetracyclin und erbrachte Nachweisgrenzen von 0,28 µg/kg (Fleisch) und 0,36 µg/kg (Leber). Die Wiederfindungsrate der mit 50–600 ng/g künstlich kontaminierten Proben lag zwischen 83–88%.

Zur Entwicklung möglicher direkter oder indirekter Testaufbauten konjugierten WONGTANGPRASERT et al. (2011) Oxytetracyclin via Mannich-Kondensation an BSA, OVA und horseradish peroxidase (HRP). Weiterhin koppelten sie die monoklonalen OTC-

BSA-Antikörper durch aktive Estermethode an Biotin. Nach Austesten unterschiedlicher Assayformate wurde der direkt kompetitive Biotin-Avidin-vermittelte Aufbau zur weiteren Entwicklung eines Testkits herangezogen. Der so hergestellte EIA ergab eine Nachweisgrenze von 1,55 ng/ml und zeigte mit Rolitetracyclin eine Kreuzreaktion von 387%. In einer späteren Studie wählte die Arbeitsgruppe einen indirekten Testaufbau unter Verwendung derselben Hybridoma-Zelllinie 2-4F zur Produktion monoklonaler Antikörper (WONGTANGPRASERT et al., 2014). Es ergab sich eine Nachweisgrenze von 0,52 µg/kg für Oxytetracyclin, zudem bestätigte sich die hohe Kreuzreaktivität von 388% gegenüber Rolitetracyclin auch in diesem Testaufbau. Validiert wurde dieser Test an Shrimps, wo er zu Wiederfindungen zwischen 82% und 118% führte.

ADRIAN et al. (2012) entwickelten einen indirekt kompetitiven EIA zum Nachweis von Doxycyclin. Zunächst stellten sie Haptene aus Methacyclin und Tetracyclin her. Zur Immunogenherstellung wurde das Methacyclin-Hapten „TC1“ an Pfeilschwanzkrebs-Hämocyanin (horseshoe crab hemocyanin, HCH) konjugiert. Die Titerbestimmung der gewonnenen Immunsereen erfolgte auf mit TC1-BSA beschichteten Mikrotiterplatten. Nach Austitration der besten Antiseren und Beschichtungsantigene wurde zur weiteren Testentwicklung zum Festphasenantigen TC1-OVA gewechselt. Beide Beschichtungsantigene, TC1-BSA wie auch TC1-OVA wurden mittels aktiver Estermethode gekoppelt. Der entwickelte Test zeigte sich sehr spezifisch für Doxycyclin, es konnte lediglich eine Kreuzreaktion von 32% für Methacyclin bestimmt werden. Nach kurzer Probenaufbereitung von Milch in McIlvaine-Puffer und 25-facher Verdünnung wurde in dieser Matrix eine Nachweisgrenze von 5 µg/l erreicht.

JIAO et al. (2012) beschreiben erstmals die simultane Detektion von Penicillinen und Tetracyclinen in Milch mittels eines indirekt kompetitiven EIA durch Herstellung eines „Bi-Haptens“. So konjugierten sie Amoxicillin und Chlortetracyclin via Glutardialdehyd-Kopplung an BSA und OVA. Sie bestätigten ihren Kopplungserfolg mittels UV-Spektrum, immunisierten Kaninchen mit Amoxicillin-BSA-CT und beschichteten ihre Mikrotiterplatten mit Amoxicillin-OVA-CT. Mit dotierten Milchproben in Höhe von 50 ng/ml und 100 ng/ml wurde das Testformat validiert und konnte für die Gruppe der Tetracycline (CT, OTC, TC und Doxy) Wiederfindungen zwischen 88,5% und 99,4% generieren.

GAO et al. (2013) entwickelten einen indirekt kompetitiven EIA durch Gewinnung monoklonaler Antikörper. Unterschiedliche Kopplungsprotokolle wurden zur Herstellung der Immunreagenzien angewandt, wobei sich das Generieren eines Haptens und anschließende Anwendung der Mixed-Anhydride-Methode zur Proteinkonjugation als am geeignetsten herausstellte. Auch in dieser Arbeitsgruppe wurde mittels UV-Spektrum der Kopplungserfolg der hergestellten Konjugate ermittelt. In der Kombination Anti-Doxy-C-BSA-Antikörper und dem Festphasenantigen CT-C-OVA wurden Kreuzreaktionen von sieben Tetracyclinen ermittelt, die zwischen 47% und 102% lagen. Probenuntersuchungen wurden an Schweinefleisch und Milch durchgeführt und ergaben Wiederfindungen zwischen 75,3-106,8%.

Die Arbeitsgruppe XU et al. (2013) generierte monoklonale anti-OTC-BSA-Antikörper und setzte diese in einem kompetitiv indirekten Versuchsaufbau ein. Als Beschichtungsantigen nutzten sie OTC-OVA. Beide Immunreagenzien erzeugten sie durch Tolidin-Kopplung. Mit dem entwickelten Test untersuchten sie Honigproben auf Oxytetracyclin-Rückstände und konnten eine Nachweisgrenze von 1,43ng/g ermitteln. Auch diese Gruppe entwickelte zusätzlich einen Lateral flow test, auf den in Kapitel 2.5.4 eingegangen wird.

WANG et al. (2014b) verwendeten zur Immunogensynthese ein Tetracyclin-Hapten, welches sie durch aktive Estermethode an BSA koppelten und zur polyklonalen Antikörpergewinnung in Kaninchen einsetzten. Die Titerbestimmung erfolgte in homologer Testanordnung, bei Optimierungsversuchen stellte sich jedoch eine heterologe Kombination als besser geeignet dar. Es zeigte sich ein um das 20-fach reduzierter IC₅₀-Wert (von 40,7 ng/ml auf 1,95 ng/ml) durch Wechsel des Beschichtungsantigens zu TC-OVA (FA). In diesem Format aufgestellt, wurde eine Nachweisgrenze von 2,89 µg/l Tetracyclin in Milch erreicht.

CHEN et al. (2016) nutzten zur Gewinnung monoklonaler Antikörper das Immunogen TC-BSA, welches sie durch Mannich-Reaktion erhielten. Analog dazu wurde TC-OVA als Beschichtungsantigen hergestellt und in einer kompetitiv indirekten Testanordnung eingesetzt. Die 50%-Dosen (IC₅₀) lagen bei 0,72 µg/l für Tetracyclin, 3,2 µg/l für Oxytetracyclin und 6,4 µg/l für Chlortetracyclin. Ihren Test validierte die Arbeitsgruppe an Milch- und Honigproben.

Bei Beschreibung mehrerer EIAs durch eine Arbeitsgruppe, wie im Falle von ZHANG et al. (2007), WONGTANGPRASERT et al. (2011) und GAO et al. (2013), wurde aus Gründen der Übersicht nur der jeweilige Testaufbau in Tabelle 11 (Anhang) aufgenommen, der seitens der Autoren weiter verfolgt und zu validen Testergebnissen führte. Ebenfalls hergestellte und funktionsfähige, aber nicht weiter verfolgte Testansätze wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt. Die Aufzählung der kommerziell erhältlichen EIA-Testkits erfolgte lediglich exemplarisch, ohne den Anspruch auf Vollständigkeit.

Für eingehendere Darstellungen der einzelnen Assayformate und Anwendungshinweise der Anbieter kommerzieller Testsysteme wird auf die jeweiligen Referenzen verwiesen.

2.5.4 Kombinierte Verfahren

Lateral-Flow Immunoassay (LFIA)

Der Immunochromatographische Assay (ICA), auch unter dem Begriff “Lateral flow test” bekannte Testaufbau, ist häufig in dem Format von Teststreifen vorzufinden und findet häufig als Schnelltest Einsatz (STEAD und STARK, 2011). Die Tests können in der Regel nach spätestens 30 Minuten ausgewertet werden (STEAD und STARK, 2011). Die Durchführung von LFIAs ist einfach, die zugrundeliegende Technik aufgrund der erforderlichen Kompartimente jedoch komplex. Wie auch bei EIAs erfolgt die Einteilung in direkte oder indirekte Testaufbauten sowie kompetitive oder nicht kompetitive Testformate (STEAD und STARK, 2011).

Die Vorteile der LFIAs liegen in der einfachen Handhabung, der Möglichkeit eines hohen Probenumsatzes, der langen Lagerfähigkeit (zwischen 12 und 24 Monaten) und der Generierung eines qualitativen oder semi-quantitativen Ergebnisses binnen weniger Minuten (STEAD und STARK, 2011). Als nachteilig sind der, im Vergleich zu mikrobiologischen Methoden, hohe Preis und das begrenzte Nachweisspektrum zu nennen (ŽVIRDAUSKIENĖ und ŠALOMSKIENĖ, 2007).

LE et al. (2011) entwickelten mit Hilfe von monoklonalen, kolloidalen Gold-gekoppelten CT-Antikörpern einen Teststreifen, und validierten diesen an Schweinemuskulatur, Hühnermuskulatur und Hühnerleber. Es konnte eine Nachweisgrenze von 0,12 ng/ml CT erreicht werden. XU et al. (2013) konnten mithilfe von Gold-gekoppelten monoklonalen anti-OTC-Antikörpern ein Testsystem erstellen, welches sie an Honigproben verifizierten. Sie konnten eine Nachweisgrenze von 2,16 ng/g Oxytetracyclin in Honig erreichen. Auch CHEN et al. (2016) koppelten ihre monoklonalen anti-TC-Antikörper an Gold (als Nanopartikel). Sie validierten ihre Teststreifen an Milch und Honig und legten ihre Cut-off-Level in Milch bei 15 µg/l (Tetracyclin, Oxytetracyclin) und 50 µg/l (Chlortetracyclin) sowie für Honig bei 40 µg/l für alle drei Tetracycline fest.

Als kommerziell erhältlicher Schnelltest erlaubt der Twinsensor^{BT} (UNISENSOR) die gleichzeitige Bestimmung von Penicillinen, Cephalosporinen und Tetracyclinen.

Wie auch beim Twinsensor^{BT}, erfordern die in verschiedenen Ausführungen erhältlichen ROSA-Testkits (Rapid One-Step Assay) lediglich das Applizieren der Probe auf dem Teststreifen (CHARM SCIENCE INC.).

Bei den genannten Tests von Charm Science Inc. und Unisensor handelt es sich um kompetitive Systeme. Die Bindung der zu detektierenden Antibiotika erfolgt an spezifische, markierte und an Membranen fixierte Rezeptorproteine. Als Marker dienen in beiden Fällen Goldpartikel. Die in einer Probenlösung enthaltenen Antibiotika blockieren die Rezeptoren, die für die nachfolgende Farbreaktion somit nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Intensität der Färbung der bandenförmig angebrachten Linien auf den Teststreifen durch die Goldpartikel ist somit umgekehrt proportional zu der Antibiotika-Konzentration in der Probe. Eine Auswertung beider Tests kann visuell mittels Referenzkarten oder instrumentell erfolgen (THAL, 2006; PERME et al., 2010).

Weiterhin zu den Lateral flow tests zählen die SNAP-Tests (IDEXX LABORATORIES INC.), die jedoch gemäß STEAD und STARK (2011) ein „Multi-Kompartiment-Lateral-flow“-Format darstellen. Nähere Angaben, wie Nachweisgrenzen, einiger kommerzieller Testkits sind in Tabelle 2 dargestellt.

Aptamer-basierter Biosensor (Enzyme-linked Aptamer Assay, ELAA)

JEONG und RHEE PAENG (2012) und WANG et al. (2014a) beschreiben den Nachweis von Tetracyclin mittels eines Aptamer-basierten Biosensors (enzyme-linked aptamer assay, ELAA). Aptamere sind kurze, einzelsträngige Oligonukleotide einer DNA oder RNA und weisen sich durch hohe Affinität und Spezifität aus. Sie werden auch als „chemische Antikörper“ bezeichnet. JEONG und RHEE PAENG (2012) konnten mittels kompetitivem Aufbau eine Nachweisgrenze von $2,10 \times 10^{-8}$ M Tetracyclin in Milch erreichen. WANG et al. (2014a) erzielten ebenfalls mittels indirekt kompetitivem Aufbau eine Nachweisgrenze von $9,6 \times 10^{-3}$ ng/ml Tetracyclin in Honig. KIM et al. (2014) stellten einen ELAA zum Nachweis von Oxytetracyclin in Milch her und konnten eine Nachweisgrenze von 12,3 ng/ml erreichen.

Tabelle 2: Nachweisgrenzen einiger kommerziell erhältlicher Testverfahren für Tetracycline

Testsystem	Testprinzip	Matrix	Nachweisgrenze Tetracycline ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				Referenz
			Chlortetracyclin	Doxycyclin	Oxytetracyclin	Tetracyclin	
Charm Blue Yellow II	Agardiffusionstest	Milch	150-200	25-75	75-100	75-100	CHARM SCIENCE INC.
Charm Cowside II	Agardiffusionstest	Milch	200-300	k. A.	75-100	50-100	CHARM SCIENCE INC.
Charm KIS Test	Agardiffusionstest (in Tuplerformat)	Niere, Muskelfleisch, Futtermittel, Wasser, Urin, Serum	k. A.	k. A.	3000	k. A.	CHARM SCIENCE INC.
Delvotest SP	Agardiffusionstest	Milch	100-150	k. A.	100	100	DSM FOOD SPECIALTIES B.V.
Milchtest MT	Agardiffusionstest	Milch	k. A.	100	100	100	PACKHAUS ROCKMANN
Charm II TMRL Milk Test	Radioimmunoassay	Milch	100	k. A.	100	20	CHARM SCIENCE INC.
Charm II Tetracycline Kits	Radioimmunoassay	Milch, Honig, Eier, Fisch, Getreide, Schweinefleisch, Serum, Urin, Wasser	10-3000	k. A.	20-3000	15-750	CHARM SCIENCE INC.
Betastar® 4D	Lateral-Flow Immunoassay	Milch	k. A.	k. A.	k. A.	10	CHR.HANSEN HOLDINGS A/S
Charm ROSA TET	Lateral-Flow Immunoassay	Milch	50-100	k. A.	50-100	10-30	CHARM SCIENCE INC.
Charm ROSA MRLBLTET	Lateral-Flow Immunoassay	Milch	50-100	k. A.	50-100	10-30	CHARM SCIENCE INC.
SNAP Tetracycline Test	Lateral-Flow Immunoassay	Milch	100	k. A.	50	50	IDEXX LABORATORIES INC.
Twinsensor [®] PT	Lateral-Flow Immunoassay	Milch	30-40	10-15	50-60	80-100	UNISENSOR
		Milch	k. A.	k. A.	60-80	80-100	PERME et al., 2010

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Ammoniumsulfat	Merck KGaA, 1.01217
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A-0281
Bernsteinsäureanhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Cat.: 23, 969-0
Casein-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-8654
Citronensäure	Merck KGaA, 1.00244
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, 1.06580
Essigsäure	Merck KGaA, 1.00063
Formaldehyde solution (37% [w/v])	Merck KGaA, 1.04003
Freund'sches Adjuvans, komplett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, F-5881
Glukoseoxidase (GOx)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G-2133
Glutaraldehyd (GA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G-5882
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, 1.04877
Magermilchpulver (MMP)	Merck KGaA, 1.15363
Meerrettichperoxidase (HRP)	Roche Diagnostics GmbH, 10814407001
Methanol	Merck KGaA, 1.06009
Natriumacetat	Merck KGaA, 106264
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Cat.: 21, 346-2
Natriumcarbonat	Merck KGaA, 1.06392
Natriumchlorid	Merck KGaA, 1.06404
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, 1.06329
Natrium-meta-Perjodat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, S-1878
Schwefelsäure	Merck KGaA, 1.00729
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-2885
Titriplex III	Merck KGaA, 1.08418
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-1379

Wasserstoffperoxid 30%

Merck KGaA, 1.07209

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen mindestens p.a.-Qualität

3.1.2 Antibiotika

Chlortetracyclin-Hydrochlorid

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-4881

Demeclocyclin-Hydrochlorid

LKT Laboratories, Inc., D1748

Doxycyclin-Monohydrat

US Biological, D9100

Minocyclin-Hydrochlorid

LKT Laboratories, Inc., M3353

Oxytetracyclin-Hydrochlorid

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, O-5875

Tetracyclin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-3258

3.1.3 Immunreagenzien

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP

DAKO A/S, P-0217

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, R-2004

3.1.4 Puffer und Lösungen

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

BSA-PBS 1%

Casein-PBS-Lösung 2%

EDTA-Succinatpuffer 0,1 mol/l

Enzymsubstrat-/Chromogenlösung für Meerettichperoxidase (nach GALLATI und PRACT, 1985):

20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

Tetramethylbenzidinlösung:

1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol

Magermilchpulver-PBS-Lösung: 1,25%, 2,5% und 5%

Methanol-PBS: 10%, 40%

Natriumacetatpuffer 1 mmol/l (pH 4,4)

Phosphatpuffer 0,01 mol/l mit 0,12 mol/l Natriumchlorid (pH 7,3) (PBS)

Schwefelsäure 1 mol/l

Succinatpuffer: 5 g Bernsteinsäureanhydrid in 1 l A. dest. (pH 4,0)

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

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Computer U 7670	DELL
Datenverarbeitungssoftware Magellan V 6.6	Tecan Austria GmbH
Dialyseschläuche Visking®, 44104	Serva Electrophoresis GmbH
ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	Tecan GmbH
Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen	
Küchenmaschine GVA2	Krups GmbH
Magnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Mikrotiterplatten, 439454	Nunc GmbH
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	Heidolph GmbH
Papierfaltenfilter, 5155506	Schleicher & Schuell
Pasteurpipetten, Cat.: 612-1702	VWR International
pH-Meter inoLab Level 1	WTW GmbH
Sartorius Waage BP 4100S	Sartorius AG
Sartorius Waage LA	Sartorius AG
Stomacher Seward Stomacher, England	
Variable 12-Kanal-Pipette 10-100 µl, 30-300 µl	Eppendorf AG
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc.
Zentrifuge Kendro Multifuge 3 S-R	Heraeus-Christ GmbH

3.1.6 Versuchstiere

Zur Gewinnung geeigneter Immunsereen wurden weibliche Kaninchen, Chinchilla-Bastard, der Fa. Charles River, Kissleg, verwendet. Die Versuchstiere wiesen vor Erstimmunisierung ein Gewicht von circa 2.000 g auf und wurden unter konventionellen Bedingungen einzeln gehalten.

Die Genehmigung der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) zum durchgeführten Tierversuch liegt unter der Nummer 265 (Az: V54-19c20/15c GI 18/5) vor.

3.1.7 Probenmaterial

Die untersuchten Proben wurden alle in einem Zeitraum von 5 Monaten, von März 2012 bis August 2012, im lokalen Lebensmitteleinzelhandel erworben. Nach Angaben des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD) und der Qualität waren alle Produkte voll lebensmitteltauglich. Ebenso waren alle Proben umhüllt und verpackt.

Bis zum Untersuchungszeitpunkt wurden die Proben bei +8 °C im Kühlschrank (Milchproben), bzw. bei mindestens -18 °C im Gefrierschrank (Fischproben) gelagert. Der Transport in das Labor erfolgte ohne Unterbrechung der Kühlkette in der Originalverpackung.

Bei den von unterschiedlichen Lebensmittelunternehmern stammenden Produkten handelte es sich um die in folgender Tabelle zusammengefassten Warengruppen.

Tabelle 3: Produktgruppen und Anzahl der Proben

Matrixcode (nach ADV-Katalog)	Untersuchungsgut	Probenanzahl (n)
001 010203	Vollmilch pasteurisiert standardisiert	5
001 104923	Pazifiklachs Filet	4
001 106005	Lachs Filet	4
001 105220	Kabeljau Filet	4

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung der Immunreagenzien

Moleküle unterhalb eines Molekulargewichts von 5.000 Dalton sind empirisch wenig immunogen (RITTENBURG, 1990). Niedermolekulare Substanzen müssen zur Induktion einer Immunogenität an ein Trägerprotein gekoppelt werden (JOCKERS et al., 1993). Aus diesem Grund waren die niedermolekularen Tetracycline (Hapten) an Träger ausreichender Größe zu binden. Als Trägermoleküle zur Immunisierung von Versuchstieren werden körperfremde Proteine mit einem Molekulargewicht > 25.000 Dalton verwendet, beispielsweise Ovalbumin (OVA) oder bovines Serumalbumin (BSA) (NEWSOME, 1986). Durch die gebundenen Haptene kann die humorale Antwort in Form einer Bildung von Antikörpern gegen diese künstlich hergestellten Immunogene induziert werden.

3.2.1.1 Formaldehydmethode

Zur Kopplung der verschiedenen Tetracycline an Makromoleküle wie BSA oder Glukoseoxidase (GOx) wurde die Mannich-Reaktion (MANNICH und KRÖSCHE, 1912) eingesetzt. Diese Kopplungsmethode war von anderen Autoren erfolgreich zur Synthese von Tetracyclin-Protein-Konjugaten eingesetzt worden (FARAJ und ALLI, 1981; LANG, 1991; MÄRTLBAUER, 1993). In dieser Arbeit wurde sie zur Kopplung von Oxytetracyclin (OTC) und Tetracyclin (TC) an GOx und BSA, sowie von Chlortetracyclin (CT) an BSA eingesetzt. Eine Übersicht aller hergestellten Kopplungsprodukte zeigt Tabelle 4.

Zur Synthese der Immunogene wurden OTC und TC an GOx gekoppelt. Die Tetracycline wurden in einem molaren Verhältnis von 200:1 zum Trägermolekül eingesetzt. 25,5 mg GOx wurden in 4 ml Natriumacetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,2) gelöst und mit 1 ml einer 10 mg/ml OTC- bzw TC-Lösung (in Methanol) versetzt. Nach vorsichtiger Zugabe von 500 µl Formaldehydlösung wurde der Ansatz 1 h unter ständigem Rühren lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung ungebundener, niedermolekularer Bestandteile wurde der Ansatz 24 h bei 6-8 °C gegen 3 x 6 l Phosphatpuffer (PBS) dialysiert.

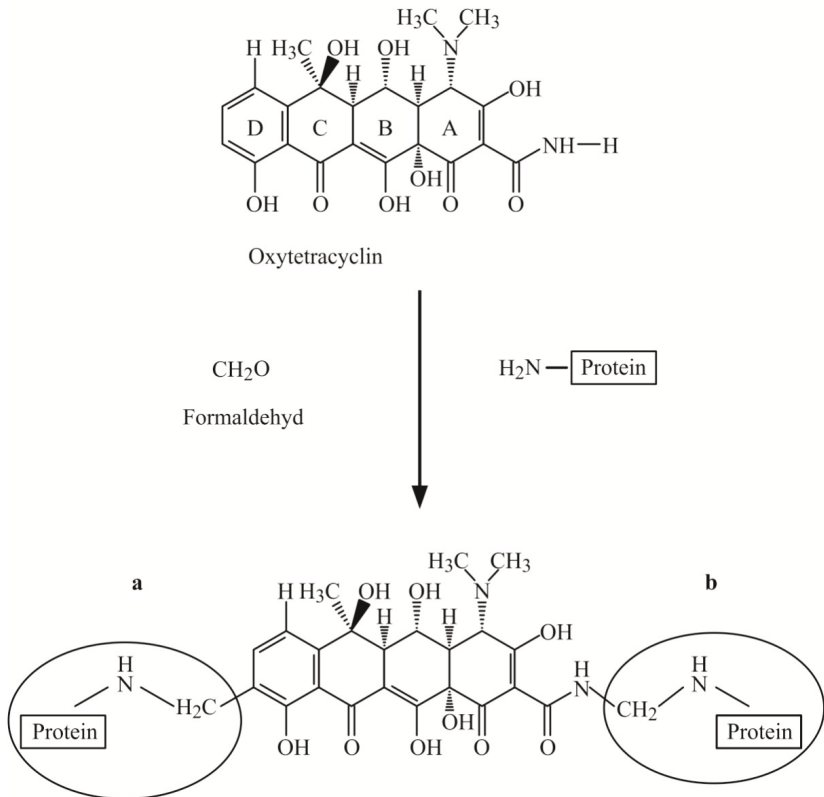


Abbildung 2: Schema der Formaldehydmethode unter Darstellung beider möglicher Kopplungsstellen (a, b) am Beispiel des Oxytetracyclinmoleküls (in Anlehnung an MÄRTLBAUER, 1993)

Die Gewinnung der Beschichtungsantigene erfolgte analog. Oxytetracyclin, Tetracyclin und auch Chlortetracyclin wurden nach der beschriebenen Verfahrensweise an BSA gekoppelt. Hierzu wurden Antibiotikum und Protein in einem molaren Verhältnis von 100:1 zur Reaktion gebracht. Für die Herstellung von OTC-BSA (FA) wurden 12,62 mg BSA in 4 ml Natriumacetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,2) gelöst und mit 1 ml OTC-Lösung (10 mg/ml Methanol) sowie 500 µl Formaldehydlösung zur Reaktion gebracht. Nach 1 h

Inkubation unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das Kopplungsprodukt 24 h gegen 3 x 6 l PBS bei 6-8° C dialysiert.

Für die Herstellung von TC-BSA (FA) wurden 14,1 mg BSA in 4 ml Natriumacetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,2) gelöst, mit 1 ml TC-Lösung (10 mg/ml Methanol) und 500 µl Formaldehydlösung zur Reaktion gebracht. Zur Synthese von CT-BSA (FA) wurden 10,25 mg BSA in 4 ml Natriumacetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,2) gelöst, 1 ml CT-Lösung (10 mg/ml Methanol; 4 min Ultraschallbad) und 500 µl Formaldehydlösung eingesetzt.

3.2.1.2 Kopplung mittels Glutardialdehydkondensation

Durch Addition von primären Aminen an die Carbonyl-Gruppen des homobifunktionellen Glutardialdehyds entstehen unter Wasserabspaltung Schiff'sche Basen. Bei den beteiligten Proteinen handelt es sich meist um deren Lysinreste (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969).

Grundsätzlich kann bei der Kopplung mittels Glutardialdehyd ein **einstufiges Verfahren** von einem **zweistufigen Verfahren** unterschieden werden.

Beim einstufigen Verfahren werden die Reagenten nacheinander zusammengegeben.

Beim zweistufigen Verfahren wird zunächst das Protein mit dem Glutardialdehyd versetzt. Durch einen nun folgenden Zwischenschritt wird das entstandene „aktivierte“ Intermediärderivat von überschüssigem Glutardialdehyd durch Aufreinigung befreit. Erst nach diesem Schritt wird das Antigen zur Kopplung hinzugefügt (AVRAMEAS et al., 1978).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Kopplungsmethoden zur Herstellung unterschiedlicher Proteinkonjugate genutzt.

Da die erfolgreiche Durchführung des einstufigen Verfahrens bereits von MÄRTLBAUER (1993), GÄRTNER (2006), THAL (2006) und MEIER (2008) beschrieben wurde, fand diese Methode auch in dieser Arbeit Anwendung.

Einstufiges Verfahren

Durch die Kopplung des Oxytetracyclins (OTC) an bovines Serumalbumin (BSA) mittels des einstufigen Verfahrens wurde das Beschichtungsantigen für den indirekt kompetitiven Versuchsaufbau erzeugt.

Hierzu wurden das Antibiotikum, Glutardialdehyd (GA) und das Trägerprotein im molaren Verhältnis von 100:100:1 eingesetzt. 19,9 mg des Oxytetracyclinhydrochlorids wurden in 2 ml 10% Methanol-PBS gelöst. BSA (26,4 mg) wurden in 2 ml PBS gelöst und zur Oxytetracyclin-Lösung hinzugegeben. 160 µl der auf 2,5% herunterverdünnten Glutardialdehyd-Lösung wurden langsam tropfenweise hinzugegeben. Lichtgeschützt wurde die Lösung bei Raumtemperatur 3 h unter ständigem Rühren inkubiert, bevor sie zwecks Aufreinigung 24 h gegen PBS (3 x 6 l) bei 6-8° C dialysiert wurde.

Zweistufiges Verfahren

Zur Herstellung eines enzymmarkierten Antigens wurde Oxytetracyclin mittels der zweistufigen Glutardialdehydmethode an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt.

Hierzu wurden zunächst 10 mg HRP in 0,5 ml PBS gelöst, mit 100 µl einer 1% Glutardialdehyd-Lösung versetzt und 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Glutardialdehyds erfolgte eine anschließende Dialyse des Ansatzes, zweimalig jeweils 3 h gegen 3 l PBS. In 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Oxytetracyclinhydrochlorid (12,4 mg) wurde zur HRP-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden 0,2 ml Bicarbonatpuffer (0,5 mol/l, pH 9,5) zugegeben und 24 h bei 6 °C inkubiert. Abschließend erfolgte die Dialyse 24 h bei 6-8° C gegen PBS (3 x 6 l).

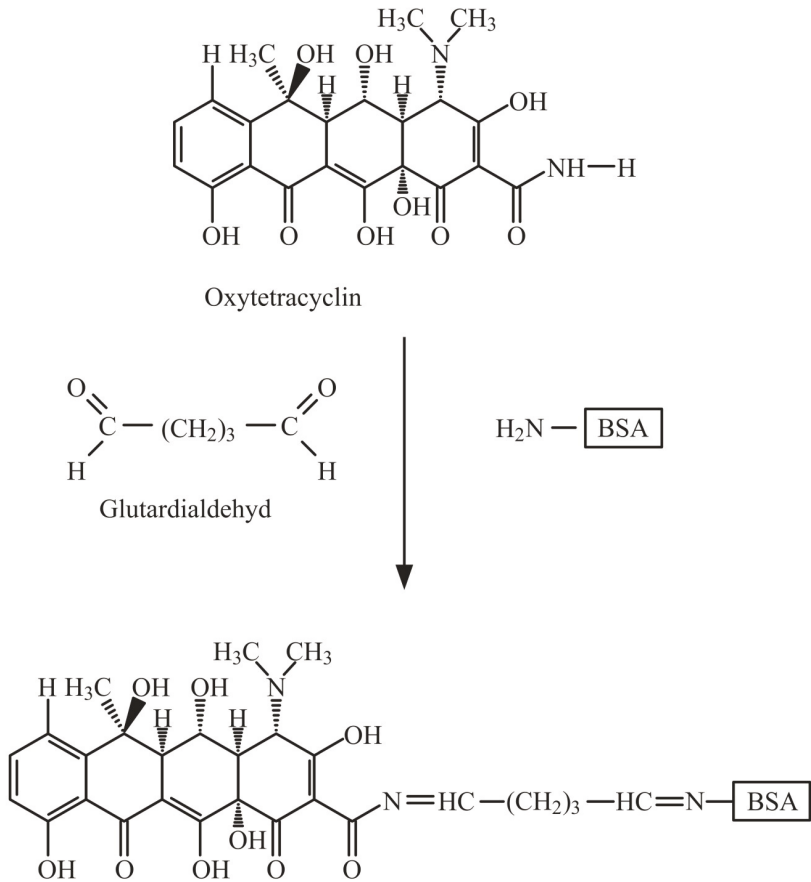


Abbildung 3: Schema der Glutarialdehydmethode am Beispiel der Kopplung von Oxytetracyclin an BSA (in Anlehnung an GÄRTNER, 2006)

3.2.1.3 Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat

Oxytetracyclin wurde in Anlehnung an die von WILSON und NAKANE (1976) beschriebene Methode an HRP gekoppelt. Natriumperjodat oxidiert die Kohlenhydratanteile des Glykoproteins HRP zu einem Dialdehyd. Unter Bildung einer Schiff'schen Base reagieren die freien Aldehydgruppen mit den primären Aminogruppen des Antibiotikums. Abschließend wird die Verbindung zu einem stabilen Amin reduziert. Die schematische Darstellung des Reaktionsablaufes zur Herstellung des Enzymkonjugates OTC-HRP kann Abbildung 4 entnommen werden. Das entstandene Produkt wurde in einem direkten Testaufbau eingesetzt.

Es wurden 4 mg der Peroxidase in 1 ml A. dest. gelöst. Nach Zugabe von 0,2 ml einer frisch angesetzten Natrium-meta-perjodat-Lösung ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die anschließende 24-stündige Dialyse fand bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ unter zweimaligem Pufferwechsel alle 8 h in 6 l Natriumacetatpuffer statt. Im zweiten Schritt wurden zu den entstandenen reaktiven Aldehydgruppen der HRP 1 ml einer OTC-Lösung hinzugegeben (100 μl einer 1 mg/ml OTC-Lösung gelöst in Methanol + 900 μl Natriumhydrogencarbonat ($0,1 \text{ mol/l}$, pH 8,3)). Im Anschluss an eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 μl der frisch angesetzten Natriumborhydrid-Lösung (4 mg/ml A. dest.) hinzugegeben und nochmals 20 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Auf die Zugabe der Borhydrid-Lösung wurde bei einem zweiten Reaktionsansatz bewußt verzichtet. Die abschließende Dialyse fand auch bei diesem Kopplungsprodukt 24 h bei $6-8 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen dreimal 6 l PBS statt.

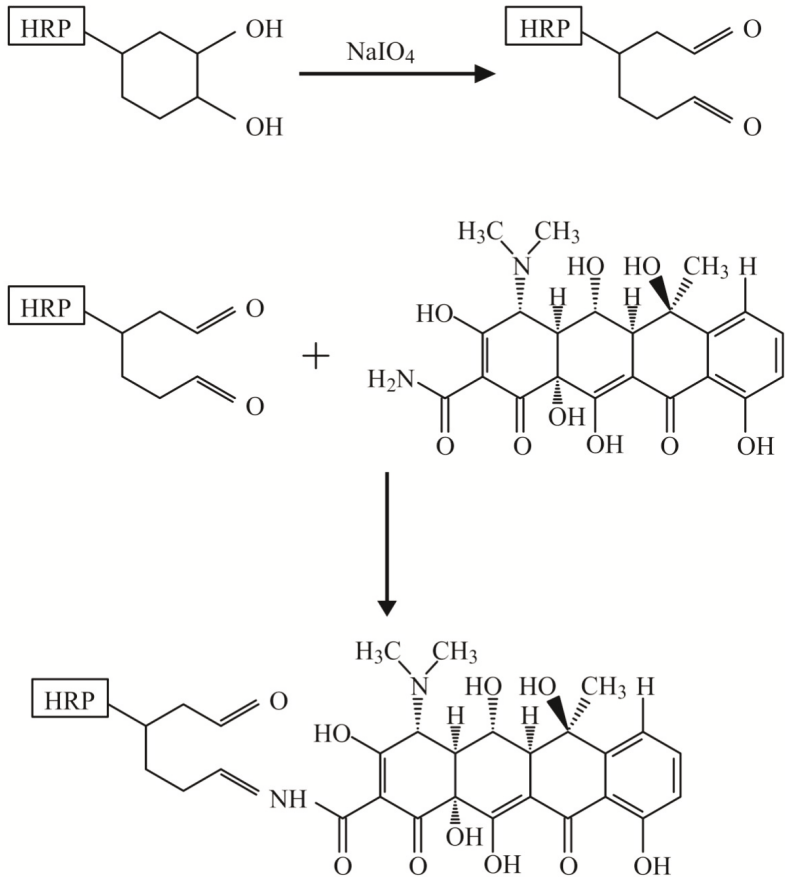


Abbildung 4: Schematische Darstellung der postulierten Kopplungsreaktion von Oxytetracyclin an HRP mittels reduktiver Alkylierung (in Anlehnung an GÄRTNER, 2006)

Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen Kopplungsprodukte

Antibiotikum	Protein	Kopplungsverfahren	Verwendung
OTC	GOx	Formaldehydmethode	Grundimmunisierung; 1. Boosterung der Kaninchen
OTC	BSA	Formaldehydmethode	Beschichtungsantigen
TC	GOx	Formaldehydmethode	2. Boosterung der Kaninchen
TC	BSA	Formaldehydmethode	Beschichtungsantigen
CT	BSA	Formaldehydmethode	Beschichtungsantigen
OTC	BSA	Glutardialdehydkondensation (1-stufiges Verfahren)	Beschichtungsantigen
OTC	HRP	Glutardialdehydkondensation (2-stufiges Verfahren)	Enzymkonjugat (direktes Testsystem)
OTC	HRP	reduktive Alkylierung	Enzymkonjugat (direktes Testsystem)

Alle hergestellten Konjugate wurden nach der Dialyse portioniert und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.2 Gewinnung spezifischer Antisera

3.2.2.1 Immunisierung

Zur Gewinnung von Antisera wurden drei Kaninchen eingesetzt, die mit den unter 3.2.1.1 beschriebenen GOx-Konjugaten OTC-GOx (FA) und TC-GOx (FA) immunisiert wurden.

Die Grundimmunisierung sowie die erste Restimulierung in der 10. Woche erfolgten mit OTC-GOx (FA). Hierzu wurden jeweils $500\text{ }\mu\text{l}$ Konjugat mit $1,5\text{ ml}$ komplettem Freund's Adjuvans (1:3 Volumenanteile) emulgiert und intracutan appliziert (NIESCHLAG et al., 1975).

Die zweite Restimulierung erfolgte unter Verwendung des TC-GOx (FA) unter den für die erste Restimulierung beschriebenen Bedingungen.

Der Zeitpunkt der Restimulierungen wurde durch den Verlauf der Titer bestimmt.

Ab der dritten Woche nach erfolgter Grundimmunisierung wurde den Kaninchen im zweiwöchigen Rhythmus Blut aus der *A. auricularis rostralis* entnommen. Das durch Zentrifugieren (15 Minuten, 1509 x g) gewonnene Serum wurde ohne weitere Aufreinigung portioniert und bei -18 °C gelagert.

3.2.2.2 Kontrolle des Immunisierungsverlaufs

Die Antikörpertiter der gewonnenen Seren wurden in einem indirekten Enzymimmuntest bestimmt. Hierzu wurden die Mikrotiterplatten mit OTC-BSA (FA) (3.2.1.1) in einer Verdünnung von 1:3.000 in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und für mindestens 24 h in einer wasserdampfgesättigten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten abgesaugt, ausgeschlagen und mit 2% Casein-PBS-Lösung (200 µl/Kavität, 30 min) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen wurden die zu testenden Antiseren in Serienverdünnungen (mindestens 1:100 und 7 weitere 1:3 Verdünnungen in PBS) im Doppelansatz pipettiert (100 µl/Kavität). Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Taumelgerät erfolgte ein weiterer Waschschriff, bevor das Enzymkonjugat (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:1.000 in PBS, 100 µl/Kavität) zugegeben wurde. Erneut folgte eine einstündige Inkubation und ein sich anschließender Waschschriff. Zum Nachweis der Peroxidase wurde schließlich Tetramethylbenzidin (TMB) als Wasserstoffdonator und H₂O₂ als Cosubstrat eingesetzt (Enzymsubstrat-/Chromogenlösung, 100 µl/Kavität). Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt. Der erfolgte Farbumschlag von blau nach gelb wurde photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Serumverdünnung, die einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab, wurde als Titer definiert.

3.2.2.3 Auswahl geeigneter Antiseren durch parallele kompetitive Titration (Hemmtitration)

Zur Definition spezifischer Eigenschaften wurden die gewonnenen Immunsereen im zweiwöchigen Blutentnahmerhythmus in einem indirekten EIA getestet. Bei diesem Testaufbau wurden die Extinktionswerte verschiedener Antiserumverdünnungen verglichen, jeweils mit und ohne Zusatz einer Oxytetracyclin-haltigen Lösung.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte, wie auch bei der Titerbestimmung, mit OTC-BSA (FA) in einer Verdünnung von 1:3.000 in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität). Die Inkubation erfolgte 24 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach Absättigung mit 2% Casein-PBS-Lösung (200 µl/Kavität, 30 min) wurden die zu testenden Antisereen in einer Anfangsverdünnung von 1:100 in PBS aufgetragen und auf der Platte 1:3, ebenfalls in PBS, weiterverdünnt (50 µl/Kavität). Die Aufteilung der Mikrotiterplatte erfolgte entsprechend Abbildung 5, sodass in die „positiven“ Kavitäten 50 µl OTC-Lösung (10 µg/ml in PBS), in die „negativen“ Kavitäten reines PBS (50 µl/Kavität) pipettiert wurde. Nach einstündigem Taumeln bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde die Platte abgesaugt, dreimalig gewaschen und trockengeschlagen, bevor die Zugabe der Enzymkonjugatlösung (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:1.000 in PBS, 100 µl/Kavität) erfolgte. Nach einer letzten Inkubation (taumelnd, 1 h bei Raumtemperatur) und einem weiteren Waschschrift wurde die Substratlösung (100 µl/Kavität) hinzugegeben und die Farbreaktion nach 10 Minuten durch Schwefelsäure gestoppt (100 µl/Kavität). Die Messung der Extinktionswerte fand bei einer Wellenlänge von 450 nm statt.

Die Seren der jeweiligen Woche aller drei Kaninchen wurden auf einer Platte getestet. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 5 dargestellt.

Antiserum	Kaninchen 1				Kaninchen 2				Kaninchen 3			
	OTC		PBS		OTC		PBS		OTC		PBS	
1: 100	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1: 300	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1: 900	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1: 2.700	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1: 8.100	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1: 24.300	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1: 72.900	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:218.700	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abbildung 5: Plattenbelegung zur Durchführung der Hemmtitration

3.2.3 Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Oxytetracyclin

3.2.3.1 Kompetitiver direkter Enzymimmuntest

Zur direkten Beschichtung von Mikrotiterplatten wurde ein Teil des Antiserums (Kaninchen 3, Pool Wochen 11-21) nach der Methode von HEBERT et al. (1973) mit Hilfe gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, gegen PBS dialysiert (3 x 6 l) und bei -18 °C aufbewahrt.

Bei der kompetitiven direkten Testanordnung konkurrieren freies (nicht markiertes) und enzymmarkiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen der Antikörper (EKINS, 1985).

Die Inkubation von Enzymkonjugat und Antigenlösung erfolgt gleichzeitig, erst danach werden ungebundene Reaktionspartner durch den folgenden Waschschrift entfernt. Die Menge an gebundenem enzymmarkierten Antigen kann direkt bestimmt werden. Nach Zugabe der Substrat-Chromogen-Lösung erfolgt eine Farbreaktion, die sich umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration des Standards oder einer Probe verhält.

Die Ermittlung der optimalen Konzentrationen der Immunreagenzien erfolgte durch doppelte Austitration von Enzymkonjugat gegen Antiserum. Hierzu wurde zur Beschichtung der Mikrotiterplatte gefälltes Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 in Bicarbonatpuffer in die Kavitäten gegeben (100 μ l/Kavität) und dann 1:2 auf der Platte weiterverdünnt. Vor der weiteren Verwendung erfolgte eine Inkubation von 24 h bei Raumtemperatur in einer wasserdampfgesättigten Kammer. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach dem Ausschlagen der Platten 30 Minuten mit 2% Casein-PBS (200 μ l/Kavität) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen wurde die eine Hälfte der Platte mit 50 μ l/Kavität einer 10 μ g/ml Oxytetracyclin-Lösung versetzt, während die andere Seite antigenfreie 10% Methanol-PBS-Lösung enthielt. Mit dem nach 3.2.1.3 hergestellten Konjugat OTC-HRP (Perjodat) wurde ebenfalls eine Serienverdünnung erstellt, um ein Verteilungsmuster zu erhalten, wie es in Abbildung 6 dargestellt ist (sogenannte „Schachbrett-Titration“). Die Verdünnung wurde in 1% Casein-PBS (50 μ l/Kavität) erstellt, der Verdünnungsbereich lag zwischen 1:100 bis 1:3.200. Es folgte die einstündige Inkubation in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur und taumelnden Bewegungen, danach ein erneuter Waschschrift. Nach Zugabe von 100 μ l/Kavität Enzymsubstrat-/Chromogenlösung wurde zum Abstoppen 1 mol/l Schwefelsäure (100 μ l/Kavität) zugegeben, bevor die photometrische Bestimmung bei 450 nm erfolgte.

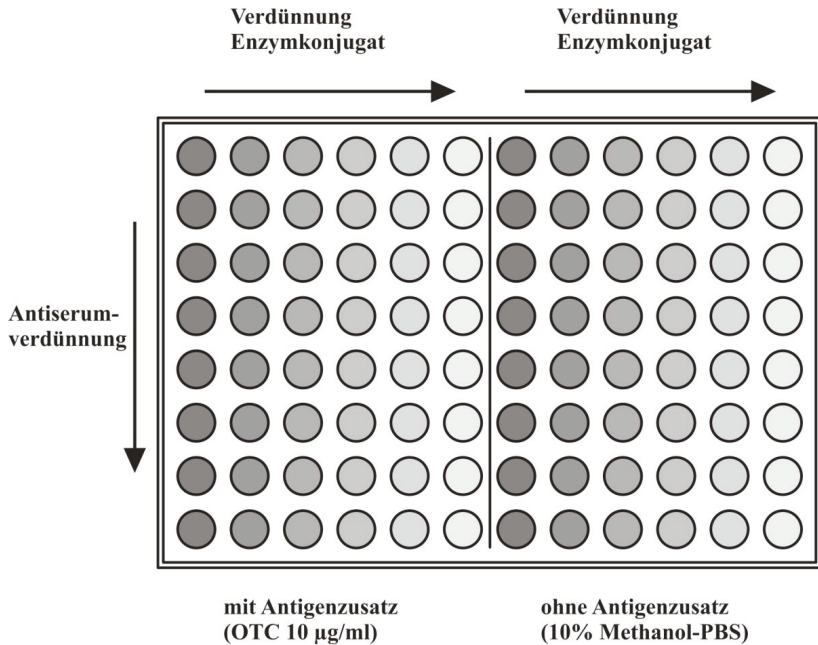


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Plattenbelegung bei Durchführung einer Schachbrett-Titration zur Ermittlung optimaler Konzentrationen der Immunreagenzien

3.2.3.2 Kompetitiver direkter Enzymimmuntest unter Verwendung einer Doppelantikörpertechnik

Bei der DASP-Technik (Double-Antibody Solid Phase) (OELLERICH, 1984; MÄRTLBAUER et al., 1988) wird ein zweiter, gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper, als Festphase zur Beschichtung genutzt. Die Platten wurden mit einem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und für 24 h bei Raumtemperatur in einer Wasserdampf gesättigten Kammer inkubiert. Danach wurden die Platten abgesaugt und ausgeschlagen. Es folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 2% Casein-PBS (30 Minuten,

200 µl/Kavität). Nach dreimaligem Waschen wurde das Antiserum (Kaninchen 3, Pool Wochen 11–21) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS zugegeben und auf der Platte 1:3 weiterverdünnt (35 µl/Kavität). Die positive Hälfte der Platte wurde mit Oxytetracyclin versetzt (10 µg/ml in 10% Methanol-PBS), auf die negative Hälfte wurde 10% Methanol-PBS pipetiert (jeweils 35 µl/Kavität). Die Plattenbelegung erfolgte, wie Abbildung 6 zeigt, als Schachbrett-Titration. Es wurde somit eine Verdünnungsreihe des zu testenden Enzymkonjugates erstellt. Die, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, hergestellte OTC-HRP (GA, zweistufiges Verfahren) wurde in 1% Casein-PBS in Verdünnungen von 1:100 bis 1:24.300 aufgetragen (35 µl/Kavität). Nach 2 h wurden die Platten dreimalig gewaschen, bevor Substratlösung (100 µl/Kavität) und zum Stoppen der Farbreaktion 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) zugegeben wurden. Das Messen der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

In gleicher Weise wurde auch das wie unter 3.2.1.3 beschrieben hergestellte Enzymkonjugat OTC-HRP (Perjodat) getestet.

3.2.3.3 Kompetitiver indirekter Enzymimmuntest

3.2.3.3.1 Durchführung

Beim indirekt kompetitiven Testaufbau wird ein Antigen-Protein-Konjugat an die Festphase gebunden. Gebundenes und freies Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen der Antikörper. Die an das Festphasen-Antigen gebundenen Antikörper werden durch enzymmarkierte Anti-Antikörper (oder auch Sekundärantikörper) nachgewiesen. Den schematischen Aufbau dieser EIA-Variante zeigt Abbildung 7.

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit einem der Protein-Konjugate (OTC-BSA (FA) bzw. OTC-BSA (GA; einstufiges Verfahren)), verdünnt in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2% Casein-PBS abgesättigt (200 µl/Kavität, 30 Minuten). Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung wurden die Antibiotika-Standards und das Antiserum zugegeben (jeweils 50 µl/Kavität) und bei Raumtemperatur eine Stunde in einer feuchten Kammer bei leichter

Bewegung inkubiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Reagenzien wurde als Enzymkonjugat Anti-Kaninchen-IgG-HRP (1:1.000 in PBS, 100 μ l/Kavität) zugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 μ l/Kavität) zugegeben. Die Umsetzungsreaktion wurde mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 μ l/Kavität) gestoppt, die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.3.3.2 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Zunächst wurden die Kombinationen aus Antiserum und Beschichtungsantigen geprüft, bei der der negative Kontrollansatz (B_0) einen Extinktionswert von circa 1 und der dazugehörige Oxytetracyclin-haltige Ansatz (B) einen größtmöglichen Extinktionsunterschied (B/B_0) aufwies. Es wurden für jede Standardkurve die 30%-, 50%-, 75%- und 80%-Werte der Kurven bestimmt (= Konzentration, die 30%, 50%, 75% und 80% der Extinktion des Leerwertes B_0 ergibt), d.h. die Konzentration an Antibiotikum, die die Bindung der Antikörper an das immobilisierte Antigen um 70%, 50%, 25% und 20% reduziert.

Als Nachweisgrenze wurde diejenige Oxytetracyclin-Konzentration definiert, welche die Bindung der Antikörper an das Festphasenantigen um 25% reduzierte und damit einen Extinktionswert von 75% des antigenfreien Nullwertes ergab. Zur statistischen Auswertung und Ermittlung der Charakteristika des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests wurden 52 Standardkurven herangezogen. Es wurden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient sowie der Minimal- und Maximalwert der Nachweisgrenze ermittelt.

Neben dem Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Oxytetracyclin-Stammlösungen und die daraus zu generierenden Standardkurven wurden unterschiedliche MMP-PBS-Konzentrationen (1,25% bis 10% MMP-PBS) der Verdünnungsreihen untersucht. Eine mögliche Auswirkung der Lagerungszeit der eingesetzten 1,25% MMP-PBS-Lösung wurde ebenso überprüft.

3.2.3.3.3 Ermittlung der Spezifität der Testsysteme

Zur Überprüfung der Spezifität des Testsystems wurden die Beschichtungs-Antigene OTC-BSA (FA) und OTC-BSA (GA; einstufiges Verfahren) in verschiedenen aufgebauten Wettbewerbsversuchen mit anderen Tetracyclinen (Tetracyclin, Chlortetracyclin, Doxycyclin, Minocyclin, Demeclocyclin) eingesetzt. Bei der Erstellung der Versuche wurde, neben unterschiedlich hohen Anfangskonzentrationen (zwischen 1 µg/ml und 50 µg/ml) der Tetracycline, verschiedenen Verdünnungsstufen der Beschichtungsantigene und unterschiedlichen Antiserumkonzentrationen auch die Auswirkung verschiedener Lösungsmittel der Serienverdünnung getestet.

Die aus den Versuchen ermittelte relative Kreuzreaktion beschreibt die Fähigkeit der eingesetzten Antikörper, neben Oxytetracyclin auch andere Substanzen, wie die hier eingesetzten Tetracyclinderivate, zu binden. Die relative Kreuzreaktion für andere Tetracycline [X] im Verhältnis zu Oxytetracyclin (Referenzwert [R]) wurde anhand der ermittelten 50%-Dosis wie folgt berechnet:

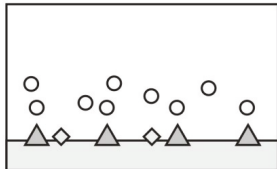
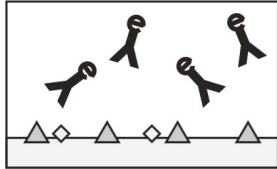
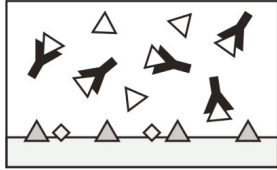
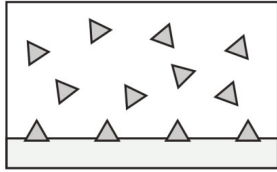
$$\text{Relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50\text{-Dosis [R]} \times \text{Molekulargewicht}}{50\text{-Dosis [X]} \times \text{Molekulargewicht}} \times 100$$

Als Modifikation des oben beschriebenen Versuchsaufbaus wurden die beiden Konjugate Tetracyclin-BSA (FA) und Chlortetracyclin-BSA (FA) (3.2.1.1) als mögliche Beschichtungs-Antigene getestet. Die Beschichtung der 96-Well-Platten wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:3.000 in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) vorgenommen, die daraufhin über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubierten. Freie Bindungsstellen wurden mit 2% Casein-PBS (100 µl/Kavität) abgesättigt. Bei Verwendung des Festphasenantigens TC-BSA (FA) wurden Standardkurven mit Oxytetracyclin sowie mit Tetracyclin in Konzentrationsbereichen von 6 pg/ml bis 10 µg/ml erstellt (50 µl/Kavität).

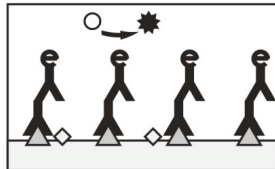
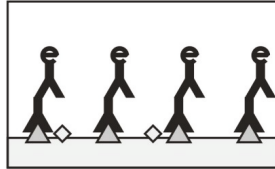
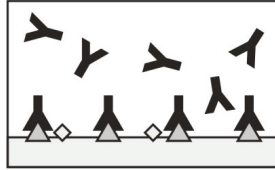
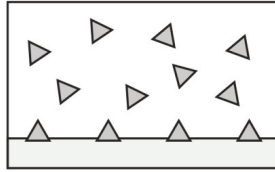
Bei Verwendung von CT-BSA (FA) als Festphasenantigen wurden gleichzeitig Standardkurven mit Oxytetracyclin und Chlortetracyclin, ebenfalls in Konzentrationsbereichen von 6 pg/ml bis 10 µg/ml auf einer Platte erstellt. In beiden Fällen wurde das Antiserum von Kaninchen 3 ((gepooled, Wochen 11-21), 50 µl/Kavität) in

der Verdünnung 1:10.000 eingesetzt. Die Testbedingungen entsprachen der in 3.2.3.3.1 beschriebenen Durchführung des kompetitiven indirekten EIA.

Positive Probe



Negative Probe



Beschichtung der
Mikrotiterplatte mit
Antigen-Protein-
Konjugat

Inkubieren der
Mikrotiterplatte mit
Antikörpern und
Probenlösung

Zugabe von Anti-
Kaninchen-IgG-
Peroxidase-Konjugat

Zugabe von Substrat;
Abstoppen der
Enzymreaktion mit
Schwefelsäure
Messen der Extinktion

△ Beschichtungsantigen

△ Freies Antigen

Y Primärer Antikörper

Y^e Enzymmarkierter anti-IgG-Antikörper

○ Enzymsubstrat

★ Farbliches Produkt nach Enzymreaktion

Abbildung 7: Aufbau eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests

3.2.4 Untersuchung von Lebensmitteln

Milch

Angelehnt an bereits erfolgreich etablierte Milchuntersuchungsverfahren und an validierte EIAs (THAL, 2006; MEIER, 2008) wurden Milchproben (pasteurisierte, homogenisierte Konsummilch (mind. 3,5% Fett)) bis kurz vor Untersuchungsbeginn im Kühlschrank bei 8 °C gelagert. Die Dotierung erfolgte in Konzentrationsbereichen zwischen dem achtel und dem doppelten MRL-Wert für OTC (12,5 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml oder 200 ng/ml). Vor dem Einsatz im Test wurde die Milch durch Zentrifugieren (1.509 x g, 4 °C, 15 min) entfettet und mindestens 1:4 mit 1,25% Magermilchpulver-PBS verdünnt. Als Negativkontrolle wurde stets eine antibiotikafreie Milch mitgeführt. Der Oxytetracyclin-Standard, wie auch die Probenverdünnungen wurden in 1,25% Magermilchpulver-PBS angesetzt.

Fisch

Die Fischfilets wurden zunächst bei Raumtemperatur angetaut und dann zerkleinert. Von diesem Material wurden 5 g abgewogen, mit 25 ml PBS versetzt und 10 min homogenisiert (Stomacher). Nach anschließender Zentrifugation (2.683 x g, 4 °C, 15 min) wurde mit einer Pasteurpipette die Fettschicht entfernt und der gewonnene Überstand abpipettiert. Eine künstliche Kontaminierung erfolgte in einem Konzentrationsbereich zwischen dem halben und zwanzigfachen MRL-Wert für Oxytetracyclin und lag somit in einem Bereich von 50 ng/g bis 2.000 ng/g. Die Zugabe erfolgte direkt auf das Homogenat. Wie auch im Falle der Milch-Untersuchungen wurden die Standards, die mitgeführten Negativkontrollen sowie die Probenverdünnungen in 1,25% Magermilchpulver-PBS vorgenommen. In die Auswertungen aufgenommen wurden die Daten der Proben ab einem Verdünnungsfaktor von 20.

Die Durchführung der EIAs erfolgte wie in 3.2.3.3.1 beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Protein- und Enzymkonjugate

Aufgrund der erfolgreichen Entwicklung eines EIAs zum Nachweis von Tetracyclin durch LANG et al. (1992) und der Erfahrungen mit vergleichbaren Haptenen (MÄRTLBAUER et al., 1992; SCHNAPPINGER et al., 1993; MÄRTLBAUER et al., 1994; MEIER, 2008) wurden für die Entwicklung des Oxytetracyclin-EIAs verschiedene einfach durchzuführende Synthesereaktionen von Proteinkonjugaten geprüft.

Die qualitative Überprüfung der hergestellten Konjugate erfolgte durch direkten Einsatz im jeweiligen Testsystem unter Verwendung der anti-OTC-Antiseren.

In den eingesetzten Tests erwiesen sich die beiden mittels Formaldehydmethode und Glutardialdehydkondensation hergestellten Beschichtungsantigene OTC-BSA (FA) und OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren) als funktionsfähig. Bei den anderen Konjugaten konnte entweder kein Messsignal im EIA erhoben werden, oder aber eine spezifische Reaktion war nicht nachweisbar. Dies betraf die beiden, mittels Glutardialdehydkondensation und reduktiver Alkylierung hergestellten Enzymkonjugate OTC-HRP, die in direkten EIAs zum Einsatz kamen. Auch konnten die Konjugate TC-BSA (FA) und CT-BSA (FA), die im kompetitiven indirekten Testaufbau als Beschichtungsantigene verwendet wurden, weder für Oxytetracyclin noch für das jeweilige Tetracyclin (Tetracyclin beziehungsweise Chlortetracyclin) verwertbare Standardkurven generieren.

4.2 Gewinnung spezifischer Antiseren gegen Oxytetracyclin

4.2.1 Immunisierungsverlauf

Der Titerverlauf der immunisierten Kaninchen wurde über den gesamten Immunisierungsablauf kontinuierlich untersucht. Alle drei Kaninchen bildeten spezifische Antikörper, die mit dem Beschichtungsantigen OTC-BSA (GA) reagierten. Eine Oxytetracyclin-spezifische kompetitive Hemmung konnte jedoch nur unter Verwendung

von Antiserum Kaninchen 3, Woche 11-21, nachgewiesen werden. Ermittelt wurden die Titer während des Versuchsablaufes durch indirekten Testaufbau mit dem Beschichtungsantigen OTC-BSA (FA). Das erst zum späteren Zeitpunkt generierte, jedoch empfindlichere Konjugat OTC-BSA (GA) ergab die in Abbildung 8 für die drei Kaninchen dargestellten Titerverläufe. Alle drei Kaninchen wiesen mit individuellen Unterschieden messbare Antikörpertiter auf ($> 0,3$ Extinktionseinheiten bei Antiserumverdünnung ≥ 100). Auf die Restimulierung in der 10. Woche mittels desselben Immunogens wie bei der Grundimmunisierung (OTC-GOx (FA)) reagierten alle drei Tiere mit einem deutlichen Anstieg der relativen Antikörpertiter. Besonders deutlich fiel der Anstieg der Antikörperproduktion bei Kaninchen Nr. 3 auf, gefolgt von Nr. 2 und Nr. 1. Die zweite Restimulierung erfolgte mit einem Tetracyclinkonjugat als Immunogen (TC-GOx (FA)). Es rief bei keinem der drei Tiere eine Erhöhung der Titer hervor.

Insgesamt stieg der Antikörpertiter bei Kaninchen Nr. 3 am stärksten auf maximale Werte von $\geq 1:19.000$ in der 13. Woche an, um danach bei allen drei, beziehungsweise ab Woche 20 bei den beiden verbliebenen Tieren K1 und K3, kontinuierlich abzufallen.

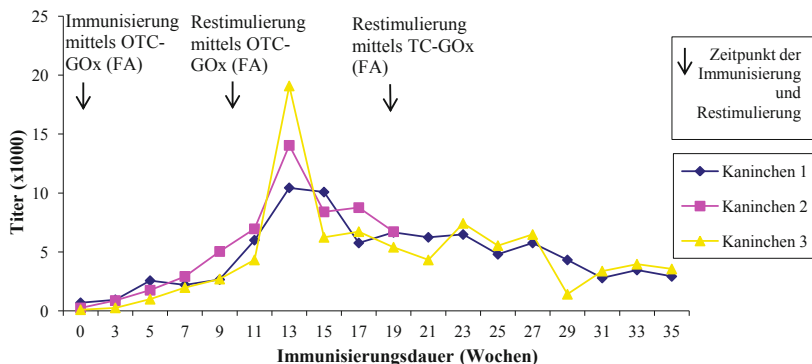


Abbildung 8: Relative Antiserumtiter der immunisierten Kaninchen Nr. 1, 2 und 3 nach Überprüfung im kompetitiven indirekten Testsystem unter Verwendung von OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren) als Festphasenantigen

4.2.2 Auswahl geeigneter Antiseren

Die Antiseren wurden in verschiedenen Testanordnungen, mit unterschiedlichen Beschichtungsantigenen und in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Die nachfolgenden Kriterien wurden als möglichst „optimale“ Kombination der Testparameter angesehen:

- der Extinktionswert der Negativprobe liegt bei etwa 1,0
- Enzymreaktionszeit von längstens 20 Minuten
- größtmöglicher Extinktionsunterschied zwischen OTC-haltiger (B) und -freier Probe (Leerwert; B_0)

Die Antiseren wurden durch Titerbestimmung (3.2.2.2), Hemmtitration (3.2.2.3) und Standardkurve (3.2.3.3) getestet. Das zunächst verwendete Beschichtungsantigen OTC-BSA (FA) wurde während der 35 Wochen dauernden Titerbestimmung im zweiwöchentlichen Turnus eingesetzt, jedoch aufgrund oben genannter Kriterien im Laufe der Arbeit ersetzt durch OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren). Um der erhöhten Testsensitivität Rechnung zu tragen, wurde dieses Festphasenantigen auch bei der Ermittlung des Titerverlaufes verwendet.

Durch die gewonnenen Informationen aus Hemmtitrationen, Standardkurven und Titerbestimmungen wurden diejenigen Seren ausgewählt, die zu einer größtmöglichen Testempfindlichkeit des zu entwickelnden EIAs führen.

Daher wurden die Seren von Kaninchen Nr. 3 von den Wochen 11-21 gepoolt und in allen weiteren Versuchen eingesetzt.

Die anderen getesteten Antiseren erbrachten nur eine sehr geringe bis keine Spezifität, so dass weiterführende Untersuchungen unterblieben.

4.3 Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Oxytetracyclin

4.3.1 Entwicklung direkter kompetitiver Enzymimmuntests

Mit dem gepoolten Antiserum von Kaninchen 3 wurden weitere Versuche zur Anwendung in einem direkten Testaufbau durchgeführt.

Mit den beiden hergestellten OTC-HRP-Konjugaten (OTC-HRP (GA, zweistufiges Verfahren) und OTC-HRP (Perjodat)) konnte kein kompetitiver EIA erstellt werden. Weitere Versuche, einen kompetitiven direkten EIA zu etablieren, konnten aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse und fehlender Erfolge hintan gestellt werden.

4.3.2 Entwicklung eines indirekt kompetitiven Enzymimmuntests

4.3.2.1 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Durch Kombination des besten Festphasenantigens mit den besten Antiseren wurde versucht, einen Test mit möglichst hoher Sensitivität, Spezifität und Robustheit zu etablieren. Die besten Ergebnisse konnten unter Verwendung des OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren) als Beschichtungsantigen erzielt werden, insbesondere eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit sowie eine Steigerung der Extinktionsunterschiede zwischen antibiotikahaltigem und -freiem Ansatz. Die Nachweisgrenze (75%-Wert) des Tests lag in Pufferlösung bei 3,8 ng/ml, die 50%-Dosis bei 12,5 ng/ml. Im Vergleich dazu lag die Nachweisgrenze unter Verwendung des „alten“ Beschichtungsantigens OTC-BSA (FA) (eingesetzte Verdünnung des Beschichtungsantigens 1:3.000 und der Antiserumverdünnung 1:8.000) bei 14 ng/ml und die 50%-Dosis bei 104 ng/ml (n=10). Das Antiserum K3 (gepoolt, Woche 11-21) konnte bei Verwendung des Beschichtungsantigens OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren) in einer Verdünnung von 1:3.000 verwendet werden. Eine Ammoniumsulfatfällung zur Gewinnung der Immunglobulinfraktion ergab keine Verbesserung der Testparameter.

Die angesetzten OTC-Stammlösungen erwiesen sich bei 8 °C stabil über einen Zeitraum von circa 7 Wochen, wie ein Vergleich zeigte (Tabelle 5).

Tabelle 5: Stabilität der OTC-Stammlösung (in Methanol) in Bezug auf den 50%- und 75%-Wert der Standardkurve

Alter der Stammlösung	Schnittpunkte (ng/ml)	
	IC 50%	IC 75%
< 2 Stunden	13,54	3,72
1 Woche	15,54	4,08
1 Monat	11,37	2,25
7 Wochen	12,67	3,89

Die Prüfung des Einflusses verschiedener Lösungsmittel zur Herstellung der Standardkurven sowie zur Probenverdünnung zeigte, dass 1,25% MMP-PBS am besten geeignet war. Andere MMP-PBS-Konzentrationen sowie andere Lösungsmittel (PBS, 1:4 Milch-PBS, 1:4 Milch-A. dest., Fischextrakt, 1% BSA-PBS, 10% Methanol-PBS, 0,05% PBS-Tween, Succinatpuffer oder EDTA-Succinatpuffer) führten zu keiner Verbesserung der Testsensitivität.

Abbildung 9 zeigt vergleichend 4 OTC-Standardkurven, hergestellt in 1,25% MMP-PBS-Lösungen nach unterschiedlicher Lagerungszeit (bei 8° C). Die Parameter 50%-Dosis und 75%-Dosis sind in Tabelle 6 angegeben.

Ergebnisse

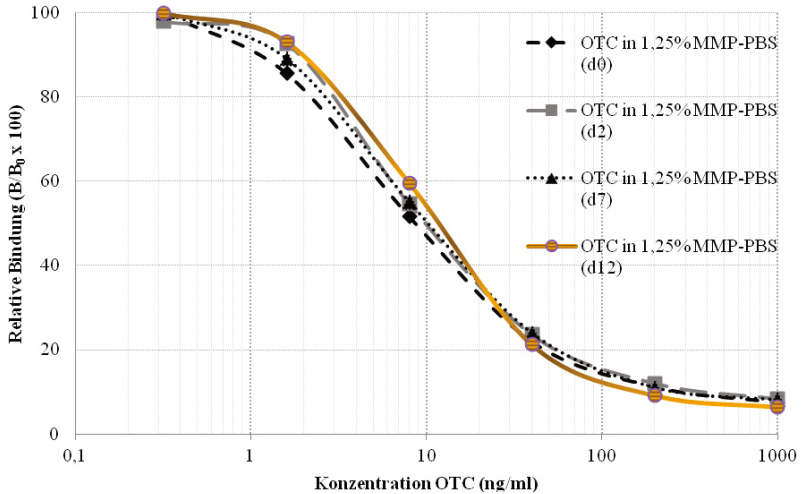


Abbildung 9: OTC-Standardkurven hergestellt in 1,25% MMP-PBS nach unterschiedlicher Lagerungszeit (0-12 Tage)

Tabelle 6: Vergleich von 50%-Dosis und 75%-Dosis von OTC-Standardkurven hergestellt in 1,25% MMP-PBS nach unterschiedlicher Lagerungszeit (0-12 Tage)

Lagerungsdauer 1,25% MMP-PBS (Tage)	Schnittpunkte (ng/ml)	
	IC 50%	IC 75%
0	8,65	2,75
2	9,71	3,54
7	10,05	3,29
12	11,53	4,19

Die Standardkurven wurden für die weiteren quantitativen Untersuchungen von Oxytetracyclin in Lebensmitteln ausschließlich mit dem Beschichtungsantigen OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren) erstellt. Die optimale Kombination der Immunreagenzien, der Pufferlösungen und der Verdünnungsreihe führte zu einem Enzymimmuntest für Oxytetracyclin, dessen Testeigenschaften in zusammengefasster Form Tabelle 7 zu entnehmen sind. Abbildung 10 zeigt eine typische Standardkurve inklusive der zur Beurteilung der Sensitivität des Tests herangezogenen 30%-, 50%-, 75%- und 80%-Dosen.

Tabelle 7: Charakteristika des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Oxytetracyclin unter Verwendung der optimierten Kombination aus Antiserum und Beschichtungsantigen

Parameter	
Antiserum (Kaninchen Nr. 3, gepoolt, Woche 11-21) eingesetzte Verdünnung	1:3.000 (verdünnt in PBS)
Beschichtung (OTC-BSA (GA; einstufiges Verfahren)) eingesetzte Verdünnung	1:1.000 (verdünnt in Bicarbonatpuffer)
Mittelwert (ng/ml) 50%-Dosis	12,5
Min. - Max. (ng/ml) 50%-Dosis	6,6-26,7
Standardabweichung (ng/ml) 50%-Dosis	4,7
Variationskoeffizient (%) 50%-Dosis	37,7
Mittelwert Nachweisgrenze (75%-Dosis) Standardkurve (ng/ml)	3,8
Min. - Max. (ng/ml) Nachweisgrenze	0,7-10,9
Standardabweichung (ng/ml) Nachweisgrenze	1,8
Variationskoeffizient (%) Nachweisgrenze	48,2
Anzahl Standardkurven	52

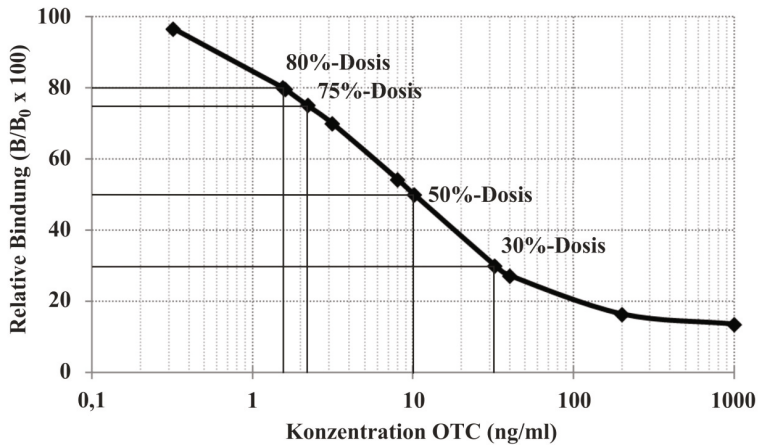


Abbildung 10: Typische Standardkurve des kompetitiv indirekten Enzymimmuntests für Oxytetracyclin unter Verwendung von Antiserum K3 (gepoolt, Woche 11-21), verdünnt 1:3000 in PBS und Beschichtungskonjugat OTC-BSA (GA, einstufiges Verfahren)

4.3.2.2 Spezifität

Mit OTC-BSA (FA) als Beschichtungsantigen konnten keine auswertbaren Standardkurven und daher keine messbaren 50%-Dosen zur Berechnung der Kreuzreaktivität durch andere Vertreter der Tetracycline (3.2.3.3.3) generiert werden.

Der Wechsel des Beschichtungsantigens zu OTC-BSA (GA; einstufiges Verfahren) ergab ausschließlich im Falle von Doxycyclin aussagefähige Extinktionsunterschiede zwischen antibiotikahaltigem und -freiem Ansatz. Es wurden Standardkurven (n=2) erstellt und der arithmetische Mittelwert beider 50%-Dosen zur Berechnung der Kreuzreaktivität herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt. Der Einsatz von MMP-PBS als Lösungsmittel erwies sich auch für die Verdünnungsreihe von Doxycyclin als am geeignetsten, in PBS konnte dagegen keine auswertbare Standardkurve erstellt werden.

Tabelle 8: Kreuzreaktivität des Antiserums von Kaninchen 3 gegen Oxytetracyclin mit anderen Tetracyclinen unter Verwendung verschiedener Beschichtungsantigene

Testsubstanz	OTC-BSA (FA)		OTC-BSA (GA)	
	50%-Dosis (ng/ml)	relative Kreuzreaktion (%)	50%-Dosis (ng/ml)	relative Kreuzreaktion (%)
Tetracyclin	-	-	/	/
Chlortetracyclin	-	-	/	/
Doxycyclin	-	-	1.324,1	1,9
Minocyclin	-	-	/	/
Demeclocyclin	-	-	/	/

-: keine ermittelbare 50%-Dosis durch entsprechende Substanz

/: keine Standardkurven zur Ermittlung der 50%-Dosis durchgeführt

4.4 Versuche zur Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests

Zur Validierung des Testsystems wurden Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit durch unterschiedliche Dotierungen der künstlich kontaminierten Proben untersucht und ausgewertet.

Milch

Die Wiederfindungsraten für dotierte Vollmilch lagen zwischen 78,3% und 133,6%. Die ermittelten Variationskoeffizienten lagen zwischen 14,6% und 43,2% und die durchschnittliche rechnerische Nachweisgrenze lag bei 14 ng/ml für Oxytetracyclin in Milch (n = 14). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Wiederfindungsraten für Oxytetracyclin in künstlich kontaminierten Milchproben

OTC-Zusatz (ng/ml)	Ergebnis Oxytetracyclin					
	Mittelwert (ng/ml)	Standard- abweichung (ng/ml)	Variations- koeffizient (%)	Wiederfindung (%)	Anzahl (n)	Anzahl positive (n)
12,5	16,7	5,7	33,9	133,6	7	2
20	15,7	5,7	36,4	78,3	5	5
25	29,8	12,9	43,2	119,3	8	7
50	48,3	14,6	30,3	96,6	7	7
100 (MRL)	97,4	14,3	14,6	97,4	4	4
200	208,7	34,0	16,3	104,4	4	4

Fisch (Lachs und Kabeljau)

Für dotierte Lachs- und Kabeljauproben lag die Wiederfindungsrate zwischen 102,6% und 247,3%. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 17,6% und 36,6% und die Nachweisgrenze des Tests betrug 88 ng/g für Oxytetracyclin in Fischfilet-Proben (n = 14). Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 10.

In einer Untersuchung zeigte der EIA bei einer aus Aquakultur stammenden Lachsprobe bereits ohne künstliche Dotierung einen positiven Befund mit einem Rückstand von 244,9 ng/g an.

Tabelle 10: Wiederfindungsraten für Oxytetracyclin in künstlich kontaminierten Fischproben (Lachs und Kabeljau)

OTC-Zusatz (ng/g)	Ergebnis Oxytetracyclin					
	Mittelwert (ng/g)	Standard- abweichung (ng/g)	Variations- koeffizient (%)	Wieder- findung (%)	Anzahl (n)	Anzahl positive (n)
50	123,6	45,3	36,6	247,3	5	4
100 (MRL)	197,6	60,2	30,5	197,6	8	7
200	336,0	109,3	32,5	168,0	5	5
400	585,8	220,7	37,7	146,4	5	5
1.000	1.152,9	202,5	17,6	115,3	7	7
2.000	2.051,7	373,8	18,2	102,6	5	5

4.5 Probenvorbereitung

Zur Untersuchung von Milchproben war es ausreichend, Milch zu entfetten und mindestens 1:4 zu verdünnen.

Aufgrund höherer unspezifischer Probenmatrixeinflüsse mussten die Fischproben mit einem Verdünnungsfaktor von mindestens 1:20 eingesetzt werden. Zudem wurde die Zentrifugation bei erhöhter Zentrifugalbeschleunigung (2.683 x g) durchgeführt. Andere Pufferlösungen (1,25% MMP-PBS, Succinatpuffer) und orientierend durchgeführte Versuche zur Extraktion (40% Methanol-PBS unter Zugabe von 1 ml EDTA-Succinatpuffer und Aufreinigung durch Filtration) ergaben keine Verbesserung der Wiederfindung. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Probenhomogenisierung der Fischfilets in PBS vorgenommen. Die weiteren Verdünnungsstufen erfolgten in 1,25% MMP-PBS.

5 Diskussion

Der Verbrauch von Tetracyclinen in der Europäischen Union belegt die wichtige Rolle dieser Antibiotikaklasse, insbesondere, was ihren Einsatz bei lebensmittelliefernden Tieren betrifft (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014). Der weltweite Verbrauch von Tetracyclinen ist mangels Daten nur schwer abzuschätzen. Aufgrund guter Verfügbarkeit und dem relativ geringen Preis muss jedoch davon ausgegangen werden, dass Tetracycline auch außerhalb der EU in hohem Maße eingesetzt werden (ROBERTS, 2003; HAMSCHER, 2008).

Der starke Einsatz von Antibiotika bei lebensmittelliefernden Tieren resultiert bei den daraus hergestellten Produkten in einem erheblichen Risiko der Rückstandsbildung (CABELLO, 2006; GRAVE et al., 2012). Nachteilige Folgen hiervon sind nicht nur die Entwicklung von Allergien sondern vor allem die problematische Verbreitung bakterieller Resistenzen (MITCHELL et al., 1998; CABELLO, 2006; GÜTTLER, 2008).

Aus Gründen des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit wird die Einhaltung der in der VO (EU) 37/2010 festgesetzten Höchstwerte (MRL) durch regelmäßige Kontrollen durch die zuständigen Behörden der Mitgliedsstaaten der Europäischen Union untersucht. So konnte die betreffende Behörde des Bundeslandes Bayern im Jahr 2013 einen positiven Trend hin zu weniger beanstandeten Proben mit Höchstwertüberschreitungen feststellen (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (LGL), 2013). Ziel dieser Studie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) war die Erfassung von Antibiotikarückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Es wurden in 61% der untersuchten Putenfleischproben und in 45% der Schweinefleischproben Antibiotika nachgewiesen, enthielten jedoch weniger als die Hälfte des zulässigen Rückstandswertes. Tetracycline wurden in rückstandshaltigen Putenfleischproben zu 85%, bei positiven Schweinefleischproben sogar in 94% der Fälle nachgewiesen. Als weiteres untersuchtes Lebensmittel tierischer Herkunft wurden in Honigproben Kontaminationen mit Tetracyclinen festgestellt. Nach Aussagen des LGL spiegelt das detektierte Stoffspektrum die Situation auf dem Arzneimittelmarkt wider, es muss somit von einem ebenso häufigen Einsatz dieser Wirkstoffgruppe bei lebensmittelliefernden Tieren ausgegangen werden. Die häufigen Antibiotikaspuren sind laut dieser Studie, trotz geringer

Konzentrationen, im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen kritisch zu betrachten (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (LGL), 2013).

Der großflächige Gebrauch von Tetracyclinen, hier vor allem von Oxytetracyclin, erfordert den Einsatz eines sensitiven und einfachen Testsystems, welches kostengünstige Screeninguntersuchungen großer Probenzahlen ermöglicht. Enzymimmunologische Nachweisverfahren sind nach wie vor eine wichtige Methode, um schnell und ohne großen apparativen und personellen Einsatz solche Tests durchzuführen. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, in einem ersten Schritt einen EIA zum spezifischen und quantitativen Nachweis von Oxytetracyclin zu entwickeln. Im Hinblick auf die Gesundheitsgefährdung, des Verbraucher- wie auch des Umweltschutzes, sollte das Testsystem idealerweise künftige Monitoringuntersuchungen auch unterhalb der MRL-Werte (soweit festgesetzt) ermöglichen und Optimierungspotential für einen noch empfindlicheren Nachweis in unterschiedlichen Matrices besitzen.

5.1 Antikörper gegen Oxytetracyclin und Entwicklung enzymimmunologischer Nachweisverfahren

Als nicht immunogen wirkendes Molekül wurde Oxytetracyclin zur Gewinnung polyklonaler Antikörper an das Makromolekül Glukoseoxidase (GOx) gekoppelt. Als Kopplungsverfahren wurde die Mannich-Reaktion (Formaldehydmethode) gewählt, da diese relativ einfach durchzuführen ist und bereits von FARAJ und ALI (1981), LANG et al. (1992), MÄRTLBAUER (1993) erfolgreich zur Herstellung von Antikörpern gegen Tetracycline beschrieben wurde.

Bereits ab der 3. Woche nach Grundimmunisierung konnten spezifische Antikörpertiter nachgewiesen werden.

Zur Erhöhung der Kreuzreaktivität wurde ein weiteres, ebenfalls durch Formaldehyd gekoppeltes Konjugat, Tetracyclin-GOx, synthetisiert und für die Restimulierung verwendet. Allerdings ergab sich lediglich für Doxycyclin eine messbare relative Kreuzreaktion, auch hier jedoch nur bei 1,02% - 2,69%.

Obwohl alle drei immunisierten Tiere messbare Antikörpertiter zeigten, konnte nur mit einem Serum ein funktionaler, kompetitiver EIA erstellt werden.

Um eine größtmögliche Sensitivität, Spezifität und Effektivität der eingesetzten Antikörper und Konjugate zu erhalten, wurde der von Kaninchen 3 gewonnene Antiserumpool in Kombination mit verschiedenen markierten Antigenen in direkten und indirekten immunochemischen Testsystemen geprüft.

Der kompetitive direkte Testaufbau unter Verwendung von OTC-HRP-Konjugaten ergab keine messbaren Signale im EIA und war daher nicht einsetzbar. LANG (1991) konnte zwar Standardkurven mittels TC-HRP generieren, jedoch erwies sich auch hier die indirekte Testanordnung bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber dem direkten EIA als überlegen.

Der weitere Schwerpunkt der Arbeit lag daraufhin auf der Optimierung des indirekten Aufbaus. Eine entscheidende Verbesserung der Ergebnisse lieferte der Einsatz des erstmals beschriebenen und zum Nachweis von Oxytetracyclin in Lebensmitteln eingesetzten Beschichtungsantigens OTC-BSA (GA; einstufig).

Schwierigkeiten bei der Herstellung von funktionsfähigen Tetracyclin-Protein-Konjugaten und der erfolgreichen Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden bereits von GOLDRING et al. (2005) beschrieben. Sie wandten zur Generierung des Beschichtungsantigens eine modifizierte Form der Glutardialdehyd-Methode an, indem sie die einzelnen Reagenten nacheinander direkt auf die Platten gaben.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die erfolgreiche Kopplung von Oxytetracyclin an BSA mittels der Glutardialdehydmethode gezeigt werden. Im Einsatz als Beschichtungsantigen, konnten auswertbare Standardkurven generiert werden. Bei maximaler OTC-Konzentration wurde eine hohe Unterdrückung des Messsignals bis auf durchschnittlich 13% (B/B_0) erreicht. Da nur der semilineare Bereich einer solchen Kurve brauchbare quantitative Ergebnisse liefert, war das Ziel die Generierung eines möglichst großen Messbereichs.

Die Kombination von Beschichtungsantigen OTC-BSA (GA; einstufig) und des Antiserumpools von Kaninchen 3 ermöglichte die Entwicklung eines sehr sensitiven indirekt kompetitiven EIA. Der semilineare Messbereich der Standardkurven lag zwischen 30% und 75% ($B/B_0 \times 100$). Die Nachweisgrenze in Pufferlösung lag bei 3,8 ng/ml.

5.2 Anwendung des Enzymimmuntests

Milch konnte nach einem Entfettungs- und Verdünnungsschritt direkt im entwickelten EIA eingesetzt werden. Nach Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnungsfaktoren wurde in dieser Matrix eine Nachweisgrenze von 14 ng/ml erreicht, diese liegt weit unter dem geforderten MRL-Wert von 100 ng/ml in Milch. Die Wiederfindung für die Dotierung im Bereich von 12,5 ng/ml bis 200 ng/ml lag zwischen 78 – 134% und zeigte, dass nach einfacher Entfettung durch Zentrifugation mit diesem neuen Test eine zuverlässige quantitative Analytik von Oxytetracyclin in Milch möglich ist.

In der Matrix Fisch konnte eine rechnerische Nachweisgrenze von 88 ng/g erreicht werden. Bei Optimierungsversuchen stellte sich durch Verwendung von 1,25% MMP-PBS sowie 40% MeOH-PBS keine Verbesserung der Probenmatrixeinflüsse ein. Die Fischfilets wurden deshalb mit PBS homogenisiert. Auch das Filtrieren des gewonnenen Extraktes verbesserte das Ergebnis nicht weiter. Zur Minimierung der starken Matrixeinflüsse wurde das Zentrifugieren des Extraktes mit höherer Zentrifugalbeschleunigung ($2.683 \times g$) vorgenommen. Wegen der starken unspezifischen Beeinträchtigungen wurden für Dotierungen im Bereich des MRL deutlich über 100% liegende Wiederfindungen gemessen, so dass bei dem hier beschriebenen Test eine Überschätzung des Rückstandsgehaltes zu erwarten ist.

Bezüglich der Entwicklung von enzymimmunologischen Verfahren, die gegen einen oder mehrere Vertreter aus der Gruppe der Tetracycline gerichtet sind, liegen bereits einige Veröffentlichungen vor. Die unterschiedlichen Testformate können aufgrund individueller Fragestellungen nur bedingt direkt miteinander verglichen werden.

So beschreiben CHÁFER-PERICÁS et al. (2010) einen Oxytetracyclin-EIA, den sie lediglich an der Probenmatrix Fisch prüften. Hier zeigte sich jedoch im Vergleich zu dem in dieser Arbeit entwickelten Test eine deutlich niedrigere Nachweisgrenz von 16 µg/kg.

WONGTANGPRASERT et al. (2011) entwickelten unter Einsatz eines Biotin-Avidin-Systems einen sehr sensitiven EIA für Oxytetracyclin, basierend auf monoklonalen Antikörpern. Die ermittelte Nachweisgrenze lag bei 1,55 ng/ml für Oxytetracyclin in Pufferlösung. Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieses Testsystems zum Nachweis von Oxytetracyclin in Lebensmitteln wurden nicht beschrieben. In einer weiteren Veröffentlichung wurde durch Modifikation des Testaufbaus eine noch niedrigere Nachweisgrenze von 0,52 ng/ml Oxytetracyclin angegeben. Validiert wurde der Test an der Probenmatrix „Shrimps“, jedoch ohne Angabe einer Nachweisgrenze (WONGTANGPRASERT et al., 2014).

Als sehr sensitives und spezifisches Nachweisverfahren entwickelten LE et al. (2012a) einen indirekten EIA mit Nachweisgrenzen von lediglich 0,28 µg/kg und 0,36 µg/kg zum Nachweis von Oxytetracyclin in Geflügelfleisch und -leber. Eine Anwendbarkeit des Nachweissystems sowie Testempfindlichkeiten in Bezug auf die Probenmatrix Milch und Fisch wurden nicht überprüft.

Auch XU et al. (2013) konnten durch den Einsatz monoklonaler Antikörper einen sehr spezifischen und sensitiven Test generieren, der jedoch lediglich in Honigproben eingesetzt wurde und eine Nachweisgrenze von Oxytetracyclin in Höhe von 1,43 ng/g erreichte. Auch hier wurden keine weiteren Lebensmittel überprüft.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Verfahren stehen auch kommerziell erhältliche immunchemische Testkits zum Nachweis von Oxytetracyclin in Lebensmitteln zur Verfügung. Das in dieser Arbeit entwickelte Nachweissystem für Oxytetracyclin wies bezüglich der Probenmatrix Milch im Vergleich zu dem System von BIOO SCIENTIFIC CORP. (2011) eine ähnliche Nachweisempfindlichkeit auf.

Neben den zum Teil sehr spezifischen EIAs, werden von manchen Autoren Testsysteme mit hoher Kreuzreaktivität beschrieben. Im Falle von GAO et al. (2013) konnten sogar monoklonale Antikörper in einem Doxycyclin-EIA eingesetzt werden und zeigten eine

Kreuzreaktivität mit Oxytetracyclin von 93%. Die Nachweisgrenze für die Probenmatrices lag, ohne genauere Differenzierung zwischen den Lebensmitteln Milch und Fleisch, bei 2,0 ng/ml für Oxytetracyclin. Fisch wurde dagegen nicht untersucht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anwendbarkeit für Rückstandsuntersuchungen für den in dieser Arbeit entwickelten Test mittels künstlich kontaminierter Lebensmittelproben (Milch, Fisch) geprüft wurde. In Milch ist der Nachweis von Oxytetracyclin weit unterhalb des gesetzlich festgelegten MRL von 100 µg/kg möglich. Für Fischfilet ist das hier beschriebene Verfahren aufgrund hoher unspezifischer Störsignale im Bereich des MRL nicht einsetzbar.

Weitere Untersuchungen zur Anwendung des EIA für Oxytetracyclin zur Untersuchung von Fischen und Erzeugnissen der Aquakultur erscheinen angezeigt, da gerade hier Oxytetracyclin das am häufigsten eingesetzte Antibiotikum ist.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Oxytetracyclin in Milch und Fisch.

Hierzu wurde erstmals zur Immunogensynthese Oxytetracyclin (OTC) an Glukoseoxidase (GOx) mittels Formaldehyd (FA) gekoppelt. Alle drei Kaninchen reagierten mit der Produktion spezifischer Antikörper auf die Impfung. Mit dem Antiserum eines Kaninchens (Nr. 3) und unter Verwendung des mittels Glutardialdehydmethode gekoppelten Beschichtungsantigens OTC-BSA (GA, einstufig) konnten im indirekten Verfahren eine Nachweisgrenze von 3,8 ng/ml in Pufferlösung erreicht werden. Die Verdünnungsreihe der Standardkurve wurde dabei in 1,25% Magermilchpulver-PBS vorgenommen.

Der Test wies eine hohe Spezifität auf und zeigte von den anderen fünf getesteten Tetracyclinen lediglich mit Doxycyclin eine Kreuzreaktivität von 1,9%.

Eine Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit erfolgte in den Lebensmitteln Milch (pasteurisierte Konsummilch) und Fisch (eingefrorene Lachs- und Kabeljaufilets). Durch einfache Entfettung und Verdünnung konnten die Proben direkt in dem entwickelten EIA eingesetzt werden. Mittels künstlicher Kontaminierung wurden Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten ermittelt. In der Probenmatrix Milch (Dotierungen zwischen 12,5 – 200 ng/ml) betrug die Nachweisgrenze 14 ng/ml, die Wiederfindungsraten lagen bei 78 - 134%. Fisch stellte sich als die problematischere Matrix heraus. Es konnte eine rechnerische Nachweisgrenze von 88 µg/kg ermittelt werden. Die Wiederfindungen lagen zwischen 102,6% und 247,3%. Bei Untersuchung der Fischproben konnte ein regressiver Verlauf der Wiederfindungen festgestellt werden, wobei Dotierungen im Bereich des MRL zu hohen Wiederfindungen weit über 100% führten.

Der hier entwickelte EIA ermöglicht einen schnellen Nachweis von Oxytetracyclin in Milch, weit unter dem MRL von 100 µg/kg, und eignet sich aufgrund seiner einfachen Probenvorbereitung gut zum Einsatz als Routineverfahren.

7 Summary

The present study describes the development of an enzyme immunoassay for the detection of oxytetracycline in milk and fish.

Herefore, to obtain the immunogen, the successful linking of oxytetracycline to Glucose-oxidase by formaldehyde procedure has been established. This method has not previously been reported. Three rabbits were immunized in order to gain polyclonal antibodies.

To establish the indirect EIA, sera of rabbit no. 3 in combination with the coating OTC-BSA (GA, one step), synthesized by glutaraldehyde (GA) method, was able to generate a limit of detection (LOD) of 3.8 ng/ml in buffer solution. Serial dilutions used for standard curves were made in 1,25% skimmed-milk-powder-PBS.

To determine the specificity of the antibodies cross reaction has been tested to five other tetracycline antibiotics. Only doxycycline showed a cross reaction of 1,9%.

First practical applicability of the test was verified with certain foodstuff like pasteurized milk and fish (frozen filets of salmon and cod). Samples could be directly analysed only after passing a defatting and dilution step. To determine the LOD's and the recovery rates, samples had to be artificially contaminated. In milk the achieved LOD was 14 ng/ml, the recovery rate was about 78 - 134% in the spiked levels of 12,5 - 200 ng/ml oxytetracycline. Concerning the sample fish it showed to be the more defiantly matrix. The LOD was 88 µg/kg in fish. Recoveries of oxytetracycline in spiked fish were 103 - 207%. The recovery rate in fish samples showed a regressive behavior taking into account that samples spiked at levels of the MRL led to recoveries exceeding 100%.

This EIA can be applied as quick detection method for oxytetracycline in milk, far below the MRL of 100 µg/kg and because of the simple sample pre-treatment it would be a suitable routine method.

8 Literaturverzeichnis

- ABRAXIS LLC, WARMINSTER, USA (2016):
Tetracyclines ELISA, Product No. 52254BA; Online verfügbar unter <http://www.abraxiskits.com/wp-content/uploads/2014/09/TetraABX-Insert092214r.pdf>
- ADRIAN, J., F. FERNÁNDEZ, F. SÁNCHEZ-BAEZA und M.-P. MARCO (2012):
Preparation of antibodies and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of doxycycline antibiotic in milk samples, *Journal of agricultural and food chemistry* **60** (15), S. 3837–3846
- AGWUH, K. N. und A. MACGOWAN (2006):
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58** (2), S. 256–265
- ANDERSON, C. R., H. S. RUPP und W.-H. WU (2005):
Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* **1075** (1-2), S. 23–32
- ARZNEIBUCH-KOMMENTAR (2015):, Unter Mitarbeit von Gunther Seitz, 1. Aufl. inkl. 51. Akt.lfg, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- AVRAMEAS, S. (1969):
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde, Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies, *Immunochemistry* **6** (1), S. 43–52
- AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1969):
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbernts, *Immunochemistry* **6** (1), S. 53–66
- AVRAMEAS, S., T. TERNYNCK und J.-L. GUESDON (1978):
Coupling of Enzymes to Antibodies and Antigens, *Scand. J. Immunol.*, S. 7–23
- BAILEY, C., A. SPIELMEYER, R. M. FRINGS, G. HAMSCHER und H. SCHÜTTRUMPF (2015):
From agricultural fields to surface water systems, The overland transport of veterinary antibiotics, *J Soils Sediments* **15** (7), S. 1630–1634
- BALDO, B. A., Z. ZHAO und N. H. PHAM (2001):
Structural determinants of antibiotic allergy, *Curr Allergy Asthma Rep* **1** (1), S. 23–31
- BAYERISCHES LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (LGL) (2013):
Erfassung von Antibiotikarückständen in ausgewählten Lebensmitteln tierischer Herkunft, Erlangen (Lebensmittelsicherheit in Bayern)
- BECKER, W. (1976):
Zur Möglichkeit einer Allergisierung und Auslösung allergischer Erscheinungen nach oraler Aufnahme von antibiotikahaltigen Lebensmitteln (Literaturauswertung), *Archiv für Lebensmittelhygiene* **27** (5), S. 181–185
- BENBROOK, C. M. (2002):
Antibiotic Use in US Aquaculture. Hg. v. The Northwest Science and Environmental Policy Center Online verfügbar unter http://iatp.org/files/421_2_37397.pdf
- BEYER, H. und W. WALTER (1981):
Lehrbuch der organischen Chemie, 19., völlig Neubearb. Aufl., Stuttgart: Hirzel

BIOO SCIENTIFIC CORP. (2011):

MaxSignal® Oxytetracycline ELISA Test Kit Manual #1081

BJÖRKLUND, H., J. BONDESTAM und G. BYLUND (1990):

Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms, *Aquaculture* **86** (4), S. 359–367

BRIYNE, N. de, J. ATKINSON, S. P. BORRIELLO und L. POKLUDOVA (2014):

Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe, *Veterinary Record* **175** (13), S. 325

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016a): Online verfügbar unter

http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/05_NRKP/Im_nrkp_node.html

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016b):

BVL - Meldungen im Europäischen Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel, Online verfügbar unter

http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/04_Schnellwarnsystem/01_aktuelle_rasff_meldungen/aktuelle_meldungen_node.html

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2015):

Jahresbericht 2013 zum Nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP), Online verfügbar unter

http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_erkp/nrkp2013_bericht.pdf?__blob=publicationFile&v=5

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016c):

Meldungen im Schnellwarnsystem aus den Vorjahren, Online verfügbar unter

http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/04_Schnellwarnsystem/02_rasff_meldungen_vergangener_Jahre/alte_meldungen_node.html

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2014):

Germap 2012, Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den

Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2015a): Online verfügbar unter

http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2015/2015_07_28_pi_Antibiotikaabgabemenge2014.html

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2015b):

Jahresbericht 2013 zum Einfuhrüberwachungsplan (EÜP), Online verfügbar unter

http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_erkp/euep2013_bericht.pdf?__blob=publicationFile&v=4

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016):

BVL - Presse- und Hintergrundinformationen - Menge der abgegebenen Antibiotika in der Tiermedizin halbiert, Online verfügbar unter http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2016/2016_08_03_pi_Antibiotikaabgabemenge2015.html

BURKIN, M. A. und I. A. GALVIDIS (2009):

Improved group determination of tetracycline antibiotics in competitive enzyme-linked immunosorbent assay, *Food and Agricultural Immunology* **20** (3), S. 245–252

CABELLO, F. C. (2006):

Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environ Microbiol* **8** (7), S. 1137–1144

CHÁFER-PERICÁS, C., Á. MAQUIEIRA, R. PUCHADES, J. MIRALLES, A. MORENO, N. PASTOR-NAVARRO und F. ESPINÓS (2010):

Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays, *Anal. Chim. Acta* **662** (2), S. 177–185

CHARM SCIENCE INC.:

ROSA TET

Charm Blue Yellow II

Charm Cowside II

Charm KIS Test

Charm II TMRL Milk Test

Charm II Tetracycline Kits

ROSA MRLBLTET

Produktinformation und Gebrauchsinformation; Homepage 2016: www.charm.com

CHEN, Y., D. KONG, L. LIU, S. SONG, H. KUANG und C. XU (2016):

Development of an ELISA and Immunochromatographic Assay for Tetracycline, Oxytetracycline, and Chlortetracycline Residues in Milk and Honey Based on the Class-Specific Monoclonal Antibody, *Food Anal. Methods* **9** (4), S. 905–914

CHOPRA, I. (1985):

Mode of Action of the Tetracyclines and the Nature of Bacterial Resistance to Them, in: R. K. Blackwood und Joseph J. Hlavka (Hg.): *The tetracyclines*, Berlin: Springer (Handbook of experimental pharmacology, 78), S. 317–392

CHOPRA, I., T. G. B. HOWE, A. H. LINTON, K. B. LINTON, M. H. RICHMOND und D. C. E. SPELLER (1981):

The tetracyclines, Prospects at the beginning of the 1980s, *J Antimicrob Chemother* **8** (1), S. 5–21

CHOPRA, I. und M. ROBERTS (2001):

Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65** (2), S. 232–260

CHR. HANSEN HOLDING A/S, HOERSHOLM; DÄNEMARK:

BetaStar® 4D, Online verfügbar unter <http://www.chr-hansen.com/food-cultures-and-enzymes/test-kits/cards/product-cards/betastar-4d#>

CLIQUET, P., E. COX, C. VAN DORPE, E. SCHACHT und B. M. GODDEERIS (2001):
Generation of Class-Selective Monoclonal Antibodies Against the Penicillin Group, *J. Agric. Food Chem.* **49** (7), S. 3349–3355

CUNHA, B. A. (1985):

Clinical Uses of the Tetracyclines, in: R. K. Blackwood und Joseph J. Hlavka (Hg.): *The tetracyclines*, Berlin: Springer (Handbook of experimental pharmacology, 78), S. 393–404

DAGHRIR, R. und P. DROGUI (2013):

Tetracycline antibiotics in the environment, A review, *Environ Chem Lett* **11** (3), S. 209–227

DSM FOOD SPECIALTIES B.V., DELFT, NIEDERLANDE:

Delvotest SP, Test Sensitivity od Detection levels, Online verfügbar unter http://www.uni-ulm.de/fileadmin/website_uni_ulm/nugi/Experimente/%C3%96kologie/Antibiotika-Nachweis/Nachweisgrenzen.Delvo.pdf

DUGGAR, B. M. (1948):

Aureomycin: A product of the continuing search for new antibiotics, *Annals of the New York Academy of Sciences* (51(2)), S. 177

DÜRCKHEIMER, W. (1975):

Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

EKINS, R. (1989):

A shadow over immunoassay, *Nature* **340** (6231), S. 256–258

EKINS, R. P. (1985):

Current concepts and future developments, in: W. P. Collins (Hg.): *Alternative Immunoassays*, Chichester, New York: Wiley (A Wiley medical publication), S. 219–237

ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry* **8** (9), S. 871–874

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2014):

Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012: Fourth ESVAC report (EMA/333921/2014), Online verfügbar unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/10/WC500175671.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) (1996):

Committee for Veterinary Medicinal Products, Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline, Summary Report (1), Online verfügbar unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015374.pdf

EVEREST, S. J., A. L. COBB, G. M. COURBOIN und R. JACKMAN (1994):

Development of an ELISA for the detection of chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline residues, *Food and Agricultural Immunology* **6** (1), S. 55–61

FARAJ, B. A. und F. M. ALI (1981):

Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **217** (1), S. 10–14

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

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **23** (8)

GAO, F., G. X. ZHAO, H. C. ZHANG, P. WANG und J. P. WANG (2013):

Production of monoclonal antibody against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk, *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* **48** (2), S. 92–100

GÄRTNER, A. (2006):

Entwicklung und Charakterisierung von Enzymimmuntests für den Nachweis von Fluorchinolonen, Diss. med. vet., München

GOLDRING, J. P. D., C. THOBAKGALE, T. HILTUNEN und T. H. T. COETZER (2005):

Raising Antibodies in Chickens Against Primaquine, Pyrimethamine, Dapsone, Tetracycline, and Doxycycline, *Immunological Investigations, Immunological Investigations* **34** (1), S. 101–114

GRAVE, K., C. GREKO, M. K. KVAALE, J. TORREN-EDO, D. MACKAY, A. MULLER und G. MOULIN (2012):

Sales of veterinary antibacterial agents in nine European countries during 2005-09: trends and patterns, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67** (12), S. 3001–3008

GRAVE, K., J. TORREN-EDO und D. MACKAY (2010):

Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65** (9), S. 2037–2040

GÜTTLER, S. (2008):

Forschung und Entwicklung in der Aquakultur, Ein Überblick über Arbeitsgebiete und offene Fragen, Online verfügbar unter <http://www.agric-econ.uni-kiel.de/Abteilungen/II/wp.shtml>

HAMSCHER, G. (2003):

Analytische Methoden, in: Heinz Nau, Pablo Steinberg und Manfred Kietzmann (Hg.): Lebensmitteltoxikologie, Rückstände und Kontaminanten: Risiken und Verbraucherschutz, mit 43 Tabellen, Berlin: Parey, S. 43–80

HAMSCHER, G. (2006):

Tierarzneimittel in der Umwelt: Vorkommen, Verhalten, Risiken, 10. Berliner Kolloquium der Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung, in: Fritz H. Frimmel und Margit B. Müller (Hg.): Heil-Lasten, Arzneimittelrückstände in Gewässern, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 105–124

HAMSCHER, G. (2008):

Review: Tierarzneimittel in der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von Stallstäuben, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, J. Verbr. Lebensm.* **3** (2), S. 165–173

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

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera, S. 26–36

- HEESCHEN, W. H. und G. SUHREN (1996):
Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk, *MILCHWISSENSCHAFT-MILK SCIENCE INTERNATIONAL* **51** (3), S. 154–160
- HERNÁNDEZ SERRANO, P. (2005):
Responsible use of antibiotics in aquaculture, Rome, Italy (FAO fisheries technical paper)
- HOFACRE, C. L., J. A. FRICKE und T. INGLIS (2013):
Antimicrobial Drug Use in Poultry, in: S. Giguère, John F. Prescott und Patricia M. Dowling (Hg.): *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 5th ed., Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, S. 569–587
- IDEXX:
Dairy SNAP ELISA technology
Tetracycline Test
Produktinformation und Gebrauchsinformation; Homepage 2016: www.idexx.de
- IDEXX LABORATORIES INC.:
SNAP Tetracycline; Online verfügbar unter <http://www.idexx.de/resource-library/dairy/snap-tetracycline-insert-en.pdf>
- JACKSON, T. M. und R. P. EKINS (1986):
Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: Current practice and potential advantages of fluorescent Eu³⁺ chelates as non-radioisotopic tracers, *Journal of Immunological Methods* **87** (1), S. 13–20
- JACOBSEN, P. und L. BERGLIND (1988):
Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms, *Aquaculture* **70** (4), S. 365–370
- 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, *Microchemical Journal* **88** (1), S. 26–31
- JEON, M. und I. RHEE PAENG (2008):
Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay, *Analytica chimica acta* **626** (2), S. 180–185
- JEONG, S. und I. RHEE PAENG (2012):
Sensitivity and selectivity on aptamer-based assay: the determination of tetracycline residue in bovine milk, *TheScientificWorldJournal* **2012**, S. 159456
- JIAO, S. N., J. LIU, Y. F. ZHANG, G. X. ZHAO und J. P. WANG (2012):
Preparation of a bi-hapten antigen and the broad-specific antibody for simultaneous immunoassay of penicillins and tetracyclines in milk, *Food and Agricultural Immunology* **23** (3), S. 273–287
- JOCKERS, R., F. F. BIER und R. D. SCHMID (1993):
Enhancement of immunoassay sensitivity by molecular modification of competitors, *Journal of Immunological Methods* **163** (2), S. 161–167
- KAHSAY, G., H. SONG, A. VAN SCHEPDAEL, D. CABOOTER und E. ADAMS (2014):
Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **87**, S. 142–154

- KIM, C.-H., L.-P. LEE, J.-R. MIN, M.-W. LIM und S.-H. JEONG (2014):
An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk, *Biosensors and Bioelectronics* **51**, S. 426–430
- KÜMPER, H. (2000):
Entstehungsweise, Therapie und Prophylaxe von Gliedmaßenkrankungen bei Kühen, *Großtierpraxis* **1** (5), S. 6–24
- LANG, B. R. (1991):
Entwicklung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Tetracyclin, Diss. med. vet. LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN, München
- LANG, B. R., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1992):
Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch, *Archiv für Lebensmittelhygiene* **43** (4), S. 77–80
- LE, T., S.-H. YI, Z.-W. ZHAO und W. WEI (2011):
Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tissues, *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* **28** (11), S. 1516–1523
- LE, T., H. YU, Y. GUO, B. NGOM, Y. SHEN und D. BI (2009):
Development of an indirect competitive ELISA for the detection of doxycycline residue in animal edible tissues, *Food and Agricultural Immunology* **20** (2), S. 111–124
- LE, T., H. YU, Z. ZHAO und W. WEI (2012a):
Development of a Monoclonal Antibody-Based ELISA for the Detection of Oxytetracycline and 4-Epi-Oxytetracycline Residues in Chicken Tissues, *Analytical Letters* **45** (4), S. 386–394
- LE, T., Z. ZHAO, W. WEI und D. BI (2012b):
Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg, *Food chemistry* **134** (4), S. 2442–2446
- LEQUIN, R. M. (2005):
Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* **51** (12), S. 2415–2418
- MANNICH, C. und W. KRÖSCHE (1912):
Über ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin, *Mitteilung aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Berlin*, S. 647–667
- MARTINDALE, The Extra Pharmacopoeia (1989):
29. Aufl., London: Pharmaceutical Press
- MÄRTLBAUER, E. (1993):
Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe: Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):
Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: production, properties, and use of rabbit antibodies, *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (1), S. 225–230

- MÄRTLBAUER, E., R. MEIER, E. USLEBER und G. TERPLAN (1992):
Enzyme immunoassays for the detection of sulfamethazine, sulfadiazine, sulfamethoxyypyridazine and trimethoprim in milk, *Food and Agricultural Immunology* **4** (4), S. 219–228
- MÄRTLBAUER, E., E. USLEBER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994):
Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides, *Analyst* **119** (12), S. 2543–2548
- MARZO, A. und L. DAL BO (1998):
Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes, A reappraisal addressed to pharmacokinetic applications, *Journal of Chromatography A* **812** (1-2), S. 17–34
- MATHERS, J. J., S. C. FLICK und L. A. COX (2011):
Longer-duration uses of tetracyclines and penicillins in U.S. food-producing animals, Indications and microbiologic effects, *Environment International* **37** (5), S. 991–1004
- MATISSEK, R., G. STEINER und M. FISCHER (2014):
Lebensmittelanalytik, 5., vollst. überarb. u. akt. Aufl. 2014, Berlin, Heidelberg: Imprint Springer Spektrum
- MCMANUS, P. S., V. O. STOCKWELL, G. W. SUNDIN und A. L. JONES (2002):
Antibiotic use in plant agriculture, *Annual review of phytopathology* **40**, S. 443–465
- MEIER, B. (2008):
Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Cefalexin, Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch, Diss. med. vet., Giessen
- 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, *Journal of food protection* **61** (6), S. 742–756
- MUTSCHLER, E. und M. SCHÄFER-KORTING (1997):
Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; 219 Tabellen, 7., völlig neu bearb. und erw. Aufl., korr. Nachdr., Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges
- NAVRÁTILOVÁ, P., I. BORKOVCOVÁ, M. DRACKOVÁ, B. JANSTOVÁ und L. VORLOVÁ (2009):
Occurrence of Tetracycline, Chlortetracyclin, and Oxytetracycline Residues in Raw Cow's Milk, *Czech J. Food Sci.* (27), S. 379–385
- NEAVES, P. (1999):
Monitoring antibiotics in milk - the changing world of test methods
- NELSON, M. L. und S. B. LEVY (2011):
The history of the tetracyclines, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1241** (1), S. 17–32
- NEWSOME, W. H. (1986):
Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods, *Journal - Association of Official Analytical Chemists* **69** (6), S. 919–923
- NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1981):
Recent advances in homogeneous and separation-free enzyme immunoassays, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **6** (1), S. 53–64

- NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):
Production of Steroid Antisera in Rabbits, in: E. H. D. Cameron, S. G. Hillier und Keith Griffiths (Hg.): Steroid immunoassay, Proceedings of the fifth Tenovus Workshop, Cardiff, April 1974, Cardiff: Alpha Omega Pub. Ltd, S. 87–96
- NOGA, E. J. (2010):
Fish disease, Diagnosis and treatment, 2nd ed., Ames, Iowa: Wiley-Blackwell
- OELLERICH, M. (1984):
Enzyme-immunoassay: a review, *J Clin Chem Clin Biochem* **22** (12), S. 895–904
- OKA, H., Y. ITO und H. MATSUMOTO (2000):
Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods, *Journal of Chromatography A* **882** (1-2), S. 109–133
- ÖNAL, A. (2011):
Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices, *Food chemistry* **127** (1), S. 197–203
- OTHERSEN, O. G., F. BEIERLEIN, H. LANIG und T. CLARK (2003):
Conformations and Tautomers of Tetracycline, *J. Phys. Chem. B* **107** (49), S. 13743–13749
- PACKHAUS ROCKMANN, SENDENHORST:
Milchtest MT; Online verfügbar unter <http://www.milchtest.de/wp-content/uploads/2013/09/1.1-Milchtest-MT-Broschuere-Hemmstofftest.pdf>
- PASTOR-NAVARRO, N., A. MAQUIEIRA und R. PUCHADES (2009):
Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products, *Anal Bioanal Chem* **395** (4), S. 907–920
- PASTOR-NAVARRO, N., S. MORAIS, Á. MAQUIEIRA und R. PUCHADES (2007):
Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues, *Anal. Chim. Acta* **594** (2), S. 211–218
- PERME, T., M. BIZJAK, K. S. GACNIK und A. KIRBIS (2010):
Validation of Twinsensor^{BT}, Screening Test for the detection of b-Lactams and Tetracyclines in milk, and comparison to Delvotest^R SP-NT, *Slovenian Veterinary Research* **47** (3), S. 97–106
- PLUMB, D. C. (2008):
Plumb's Veterinary Drug Handbook, 6. ed., Ames, Iowa: Blackwell
- POMP, E. J. und H. BÜNING-PFAUE (1996):
Mobilization and analytical availability of drug residues in food, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **202** (4), S. 263–265
- RANDOX FOOD DIAGNOSTICS LTD., CRUMLIN, UK (2016):
Oxytetracycline SENSITIVE Online verfügbar unter <http://www.randoxfood.com/oxytetracycline-elisa>
- R-BIOPHARM AG:
RIDASCREEN Tetracyclin, Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclin, Art. No. R3505, Online verfügbar unter <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4137/R3505-Tetracyclin-14-04-27.pdf>

- RIGOS, G. und G. M. TROISI (2005):
Antibacterial Agents in Mediterranean Finfish Farming, A Synopsis of Drug Pharmacokinetics in Important Euryhaline Fish Species and Possible Environmental Implications, *Rev Fish Biol Fisheries* **15** (1-2), S. 53–73
- RITTENBURG, J. H. (1990):
Fundamentals of Immunoassay, in: James H. Rittenburg (Hg.): Development and application of immunoassay for food analysis, London: Elsevier Applied Science, S. 29–57
- ROBERTS, M. C. (2003):
Tetracycline Therapy: Update, *Clin Infect Dis* **36** (4), S. 462–467
- ROTE LISTE (2007):
Rote Liste 2007, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte), Aulendorf/Württ.: Editio Cantor
- ROTH, H. J. (1997):
Arzneistoffanalyse, Reaktivität, Stabilität, Analytik; 19 Tabellen, 3., Neubearb. Aufl., 1. korrigierter Nachdr., Stuttgart [u.a.]: Thieme (Thieme-Taschenlehrbuch Pharmazie, 2)
- SARMAH, A. K., M. T. MEYER und A. B. A. BOXALL (2006):
A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* **65** (5), S. 725–759
- SCHENCK, F. J. und P. S. CALLERY (1998):
Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk, *Journal of Chromatography A* **812** (1-2), S. 99–109
- SCHNAPPINGER, D. und W. HILLEN (1996):
Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms, *Archives of Microbiology* **165** (6), S. 359–369
- SCHNAPPINGER, P., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1993):
Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk, *Food and Agricultural Immunology* **5** (2), S. 67–73
- SCHUURS, A. H. und B. K. VAN WEEMEN (1980):
Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool, *Journal of immunoassay* **1** (2), S. 229–249
- STEAD, S. und J. STARK (2011):
Bioanalytical Screening Methods, in: Jian Wang, James D. MacNeil und Jack F. Kay (Hg.): Chemical analysis of antibiotic residues in food, Hoboken, N.J.: Wiley & Sons, S. 153–186
- SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1996):
Detection of inhibitors in milk by microbial tests A review, *Nahrung* **40** (1), S. 1–7
- TARBIN, J. A., R. A. POTTER, A. A. M. L. STOLKER und B. BERENDSEN (2011):
Single-Residue Quantitative and Confirmatory Methods, in: Jian Wang, James D. MacNeil und Jack F. Kay (Hg.): Chemical analysis of antibiotic residues in food, Hoboken, N.J.: Wiley & Sons, S. 227–262
- TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):
Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch - eine kurze Übersicht, *Milchwissenschaft* **22** (12), S. 761–771

THAL, J. (2006):

Entwicklung eines immunchemischen Nachweisverfahrens für Cefquinom, Diss. med. vet. JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN, Gießen

TOLMIEN, I. M. (2011):

Validierung eines Multiuntersuchungsverfahrens zum Nachweis von Antibiotika in Fischen und Krebstieren, sowie Untersuchungen zur Rückstandssituation bei Fischen und Krebstieren aus Aquakulturen, Diss. med. vet. TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER, Hannover

UNISENSOR:

Twinsensor^{BT}, Online verfügbar unter <http://www.unisensor.be/media/pdf/leaflet/dairy-twinsensor-leaflet-BD.pdf>

VAN WEEMEN, B. K. und A. SCHUURS (1971):

Immunoassay using antigen—enzyme conjugates, *FEBS Letters* **15** (3), S. 232–236

WANG, S., W. YONG, J. LIU, L. ZHANG, Q. CHEN und Y. DONG (2014a):

Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey, *Biosensors and Bioelectronics* **57**, S. 192–198

WANG, Z., Y. SHENG, H. DUAN, Q. YU, W. SHI und S. ZHANG (2014b):

New haptens synthesis, antibody production and comparative molecular field analysis for tetracyclines, *RSC Adv* **4** (96), S. 53788–53794

WILSON, M. B. und P. K. NAKANE (1976):

The covalent coupling of proteins to periodate-oxidized sephadex: A new approach to immunoabsorbent preparation, *Journal of Immunological Methods* **12** (1-2), S. 171–181

WISDOM, G. B. (1976):

Enzyme-Immunoassay, *Clinical Chemistry* **22** (8)

WONGTANGPRASERT, T., W. NATAKUATHUNG, U. PIMPITAK, A. BUAKEAW, T. PALAGA, K. KOMOLPIS und N. KHONGCHAREONPORN (2014):

Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp, *Journal of Zhejiang University SCIENCE B, J. Zhejiang Univ. Sci. B* **15** (2), S. 165–172

WONGTANGPRASERT, T., T. PALAGA, K. KOMOLPIS und N.

KHONGCHAREONPORN (2011):

Development of Oxytetracycline test kit using Enzyme-linked Immunosorbent Assay technique, in: 2011 International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBEE, Bd. 13, S. 6–10

XU, S., L. HOU, A. J. WUBIE, T. CAO, Y. HU, W. LI ET AL. (2013):

Anti-oxytetracycline monoclonal antibody based detection of oxytetracycline residue in honey, *Journal of Food Agriculture & Environment* **11** (2), S. 249–257

ZELLER, W. (1992):

Wissenschaftliche Tagung über den Feuerbrand, Ladenburg, 13. - 14. Juni 1991. Hg. v. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin (Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem), Online verfügbar unter

<http://web.archive.org/web/20071013142628/http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt282.pdf>

- ZHANG, Y., S. LU, W. LIU, C. ZHAO und R. XI (2007):
Preparation of Anti-Tetracycline Antibodies and Development of an Indirect Heterologous Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Residues of Tetracycline in Milk, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2), S. 211–218
- ZHAO, C. B., D. P. PENG, Y. L. WANG, L. L. HUANG, D. M. CHEN, Y. F. TAO und Z. H. YUAN (2008):
Preparation and validation of the polyclonal antibodies for detection of chlortetracycline residues, *Food and Agricultural Immunology* **19** (2), S. 163–174
- ŽVIRDAUSKIENĖ, R. und J. ŠALOMSKIENĖ (2007):
An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk, *Food Control* **18** (5), S. 541–547

Zitierte Rechtsvorschriften

Entscheidung der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen (97/747/EG)

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 303/12 vom 6.11.97

Entscheidung der Kommission vom 11. Januar 2005 zur Festlegung einheitlicher Normen für die Untersuchung von aus Drittländern eingeführten Erzeugnissen tierischen Ursprungs auf bestimmte Rückstände (2005/34/EG)

Amtsblatt der Europäischen Union L 16/61 vom 20.1.2005

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB) vom 01.09.2005, in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. Juni 2013 (BGBl I S. 1426), das durch Artikel 4 Absatz 19 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl I S. 1666) geändert worden ist

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 Entscheidung 89/187/EWG und 91/664/EWG

ABl L 125 vom 23.5.1996, S. 10

Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel

ABl L 311 vom 28.11.2001, S. 1

Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI-Arzneimittelverordnung – DIMDI-AMV) vom 24.02.2010 (BGBl. I S. 140), die zuletzt durch Artikel 54 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist

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

ABl L 224 vom 18.8.1990, S. 1

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

ABl L 31 vom 1.2.2002, S. 1

Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates

Amtsblatt der Europäischen Union L 152/11 vom 16.6.2009

Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 zur Festlegung von Gemeinschaftsverfahren für die Genehmigung und Überwachung von Human- und Tierarzneimitteln und zur Errichtung einer Europäischen Arzneimittel-Agentur

ABl L 136 vom 30.4.2004, S. 1

Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung
Amtsblatt der Europäischen Union L 268/29 vom 18.10.2003

Verordnung (EG) Nr. 136/2004 der Kommission vom 22. Januar 2004 mit Verfahren für die Veterinärkontrollen von aus Drittländern eingeführten Erzeugnissen an den Grenzkontrollstellen der Gemeinschaft
Amtsblatt der Europäischen Union L 21/11 vom 28.1.2004

Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
Amtsblatt der Europäischen Union L 15/1 vom 20.1.2010

9 Anhang

Tabelle 11: Enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln

Leitsubstanz	Immungen und Antikörper	Tierart	Proteinkonjugat/ Beschichtungs-Antigen	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	Matrix	Kreuzreaktion (%)	Referenz	Anmerkung
Tetracyclin	TC-BSA ¹⁾ polyklonal	Kaninchen	TC- β -Casein ¹⁾	indirekt	3	Milch	CT (87) RTC (104) MNC (114) DEM (33) OTC (4) Doxy (4)	LANG et al., 1992	
Tetracyclin	TC-OVA ⁴⁾ polyklonal	Schaf	TC-HRP ⁴⁾	direkt	50 1,5	Niere Milch	RTC (<2)	EVEREST et al., 1994	
Tetracyclin	OTC-KLH ^{2), 6)} polyklonal	Kaninchen	TC-OVA ¹⁾	indirekt	0,4	Hong	CT (10) MC (14) OTC (30) RTC (91)	PASTOR-NAVARRO et al., 2007	
Tetracyclin	TC-cBSA ⁵⁾ polyklonal	Kaninchen	TC-PABA-cOVA ⁶⁾	indirekt	k.A. (IC ₅₀ (50%-Dosis): 3920 $\mu\text{g/l}$ in PBS)	Milch	CT (112) OTC (<2)	ZHANG et al., 2007	
Tetracyclin	kommerzieller anti-TC-Ak polyklonal	Schaf	TC-OVA ^{k.A.)}	indirekt	0,048	Milch	CT (14) OTC (10)	JEON et al., 2008	Biotin-Avidin vermittelter EIA

Fortsetzung Tabelle 11

Leitsubstanz	Immuno- gen und Antikörper	Tierart	Proteinkonjugat/ Beschichtungs- Antigen	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)	Matrix	Kreuzreaktion (%)	Referenz	Anmerkung
Tetracyclin	kommerzieller anti-TC-Ak ⁽⁷⁾ polyklonal	Schaf	TC-OVA ^{k.A.)}	indirekt	0,19	Honig	negativ	JFON und RHEE PAENG, 2008	Bohin-Avidin, vermittelter EIA
Chlortetracyclin	CT-BSA ^{(2), (4)} polyklonal	Kaninchen	CT-OVA ^{(2), (4)}	indirekt	1,18 1,66 1,72 1,18 1,72 1,20	Fleisch (Schw.) Leber (Schw.) Niere (Schw.) Fleisch (Gefl.) Leber (Gefl.) Fisch	TC (3)	ZHAO et al., 2008	
Tetracyclin	TC-BSA ⁽¹⁾ polyklonal	k.A.	CT-Transferrin ⁽⁹⁾	indirekt	0,1	k.A.	CT (105) OTC (20) MC (24) MNC (70) Doxy (25)	BURKIN und GALYVIDIS, 2009	
Doxycyclin	Doxy-PABA-BSA ^{(8), (11)} polyklonal	Kaninchen	Doxy-PABA-OVA ^{(8), (11)}	indirekt	1,96	k.A. (Fleisch, Leber, PBS)	OTC (11) MC (5) TC (4) CT (<2)	LE et al., 2009	
Oxytetracyclin	OTC-KLH ^{k.A.)}	Kaninchen	TC-OVA ⁽¹⁾	indirekt	16 1,6 5,3	Fisch PBS-Tween MeOH-H ₂ O + EDTA	TC (1028) CT (28) RTC (446) Doxy (8) MC (5)	CHÁFER-PERICÁS et al., 2010	AK's erhalten unter Verweis auf PASTOR-NAVARRO et al. (2007)

Fortsetzung Tabelle 11

Leifsubstanz	Immuno-gen und Antikörper	Tierart	Proteinkonjugat / Beschichtungs-Antigen	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze (µg/kg bzw. µg/l)	Matrix	Kreuzreaktion (%)	Referenz	Anmerkung
Chlortetracyclin	CT-BSA ⁴⁾ monoklonal	Maus	CT-OVA ⁴⁾	indirekt	0,06 0,07	Fleisch (Gefl.) Leber	negativ	LE et al., 2011	
Oxytetracyclin	OTC-BSA ¹⁾ monoklonal	Maus	anti-OTC-mAK- Biotin ⁶⁾ /OTC- OVA ¹⁾	direkt	1,55	k.A.	RTC (387) CT (7) TC (<2)	WONGTANG- PRASERT et al., 2011	Biotin-Avidin vermittelter EIA
Doxyzyclin	TCI-HCH ^{2), 8)} polyklonal	Kaninchen	TCI-OVA ^{2), 6)}	indirekt	5	Milch	MC (32)	ADRIAN et al., 2012	TCI : Hapten aus Methacyclin
Chlortetracyclin	Amoxicillin-BSA- CT ¹⁰⁾ polyklonal	Kaninchen	Amoxicillin-OVA- CT ¹⁰⁾	indirekt	CT (1,3) TC (1,8) OTC (2,4) Doxy (3,7)	PBS	TC (81) OTC (59) Doxy (31)	JIAO et al., 2012	Einsatz von "Bi- Haptenen"
Oxytetracyclin	OTC-BSA ¹¹⁾ monoklonal	Maus	OTC-OVA ¹¹⁾	indirekt	0,13 0,28 0,36	PBS Fleisch (Gefl.) Leber (Gefl.)	4-epi-OTC (99)	LE et al., 2012a	
Doxyzyclin	Doxy-PABA- BSA ^{8), 11)} monoklonal	Maus	Doxy-PABA- OVA ^{8), 11)}	indirekt	0,14	PBS	negativ	LE et al., 2012b	

Fortsetzung Tabelle 11

Leitsubstanz	Immungen und Antikörper	Tierart	Proteinkonjugat/ Beschichtungs-Antigen	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	Matrix	Kreuzreaktion (%)	Referenz	Anmerkung
Doxyeyclin	Doxy-C-BSA ^{2), 8)} monoklonal	Maus	CT-C-OVA ^{2), 8)}	indirekt	Doxy (1,6) TC (4,6) OTC (2,0) CT (5,4) MNC (6,9) MC (1,5) DEM (6,5)	k.A. (Fleisch, Milch)	TC (68) OTC (93) CT (65) MNC (47) MC (102) DEM (49)	GAO et al., 2013	Doxy-C: Hapten aus Doxyeyclin CT-C: Hapten aus Chlorotetracyclin
Oxytetracyclin	OTC-BSA ³⁾ monoklonal	Maus	OTC-OVA ³⁾	indirekt	1,43	Honig	negativ	XU et al., 2013	
Tetracyclin	TC-BSA ^{2), 6)} polyklonal	Kaninchen	TC-OVA ¹⁾	indirekt	2,89	Milch	CT (9) OTC (6) RTC (78)	WANG et al., 2014b	
Oxytetracyclin	OTC-BSA ¹⁾ monoklonal	Maus	OTC-OVA ¹⁾	indirekt	0,52	k.A.	RTC (388) TC (4)	WONGTANG-PRASERT et al., 2014	
Tetracyclin	TC-BSA ¹⁾ monoklonal	Maus	TC-OVA ¹⁾	indirekt	k.A. (IC ₅₀ : 0,72 $\mu\text{g/l}$)	Milch Honig	OTC (22) CT (11) DEM (23) Doxy (7) MC (14)	CHEN et al., 2016	

Fortsetzung Tabelle 11

Leitsubstanz	Immunogen und Antikörper	Tierart	Proteinkonjugat / Beschichtungs-Antigen	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze (µg/kg bzw. µg/l)	Matrix	Kreuzreaktion (%)	Referenz	Anmerkung
Tetracyclin	kommerzieller Ak	k.A.	k.A.	direkt	4	Hong Milch Fleisch Shrimps Wasser	OTC (95) DEM (88) RTC (82) CT (81) MC (60) Doxy (53)	ABRAXIS LLC, 2016, Produktinfor- mation No. 52254BA	
Oxytetracyclin	kommerzieller Ak	k.A.	k.A.	indirekt	4 3	Hong Fleisch, Fisch, Shrimps Milch Milchpulver Serum Urin	CT (108) MNC (79) DEM (37) TC (124) Doxy (62)	BIOO SCIENTIFIC CORP., 2011, Produktinfor- mation, Cat. 1081	
Tetracyclin	kommerzieller Ak	k.A.	k.A.	indirekt	50	Milch	OTC (k.A.) CT (k.A.)	IDEXX, Produktin- formation IDEXX SNAP Tetracycline Test	

Fortsetzung Tabelle 11

Leitsubstanz	Immunogen und Antikörper	Terart	Proteinkonjugat/ Beschichtungs- Antigen	EIA-Prinzip	Nachweisgrenze (µg/kg bzw. µg/l)	Matrix	Kreuzreaktion (%)	Referenz	Anmerkung
Oxytetracyclin	kommerzieller Ak	k.A.	k.A.	k.A.	3,92 20	Honig Fisch, Shrimps	TC (>100) RTC (>100) CT (98) DEM (79) Doxy (44) MC (21)	RANDOX FOOD DIAGNOSTICS LTD., 2016, Produktinfor- mation Oxytetracycline SENSITIVE ELISA	
Tetracyclin	kommerzieller Ak	k.A.	k.A.	indirekt	1 5 4 4 2 1,5	Milch Milchpulver Käse Honig Fleisch Fisch, Shrimps	CT (70) RTC (34) DEM (26) OTC (13) MNC (3) Doxy (2)	R-BIOPHARM, 2015, Produktin- formation Art. No. R3505	

Fortsetzung Tabelle 11

Ak: Antikörper	1) Mannich-Reaktion (Formaldehydmethode)
eBSA: kationisiertes BSA	2) zunächst Generierung eines Haptens
CDI: Carbonyldiimidazol	3) Tolidin-Methode
eOVA: kationisiertes OVA	4) EDC-Methode
DEM: Dextranocyclin	5) CDI-Methode
EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimid	6) aktive Estermethode
Gefl: Geflügel	7) durch Amidbindung konjugiertes TC-BSA
HCH: Horschorse Crab Hemocyanin	8) "MA"-Methode (Mixed-Anhydride Method)
k.A.: keine Angaben	9) Reduktive Alkylierung mittels Natriumperodat
KanA: Kaninchen-Albumin	10) Glutaraldehyd-Methode
mAK: monoklonaler Antikörper	11) Diazonium-Kopplungsmethode
MC: Methacycline	
MNC: Minocyclin	
OVA: Ovalbumin	
PABA: p-Aminobenzoessäure	
RTC: Rolitetracyclin	
Schw.: Schwein	

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Usleber für die Überlassung des Themas und die geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. Y. Ackermann und Frau Dr. M. Groß gilt mein Dank für die Vorbereitung des praktischen Versuchsablaufes. Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Groß für die gründliche Einarbeitung und stete Betreuung in allen Fragen.

Ohne die weitere praktische Unterstützung von Frau Margit Kessler und Frau Renate Stumpf sowie das Organisationsvermögen von Frau Christa Zeidler wäre eine reibungslose Durchführung nicht möglich gewesen. Für die vielen kleinen und großen Tipps, Hinweise und Hilfestellungen möchte ich mich bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt auch allen lieben Freunden und Kollegen, die mich in jeder Situation unterstützt haben.

Und natürlich gilt meine größte Hochachtung und mein Dank meiner lieben Familie. Ohne euch wären sicherlich viele Ideen in meinem Leben nicht umsetzbar gewesen und Träume wohl auch solche geblieben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Posterpräsentation bereits veröffentlicht:

REITZENSTEIN; S., M. GROSS, Y. ACKERMANN, und E. USLEBER (2013):

Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests zum Nachweis von Oxytetracyclin in Lebensmitteln

54. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: 24.09.-27.09.2013, 186

