



**ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG ENZYM-  
IMMUNOLOGISCHER VERFAHREN ZUM  
NACHWEIS VON CEFALEXIN, CEFTIOFUR  
UND DESFUROYLCEFTIOFUR IN MILCH**

**BIANCA MEIER**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. E. Usleber

**Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer  
Verfahren zum Nachweis von  
Cefalexin, Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**BIANCA MEIER**

Tierärztin aus Euskirchen

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2007

*Meiner Oma in Dankbarkeit und zum Gedenken*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Cephalosporine</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Geschichte der Cephalosporine</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Charakterisierung der Cephalosporine</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Struktur und Einteilung der Cephalosporine</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Physikalisch-chemische Eigenschaften</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Biologische Eigenschaften</b>	<b>10</b>
2.2.3.1	Antibiotisches Wirkprinzip	11
2.2.3.2	Wirkungsspektrum	12
2.2.3.3	Resistenzentwicklung	14
2.2.3.4	Pharmakokinetik	16
2.2.3.4.1	<i>Resorption</i>	16
2.2.3.4.2	<i>Verteilung</i>	17
2.2.3.4.3	<i>Metabolisierung und Elimination</i>	18
2.2.3.5	Toxizität und Nebenwirkungen	28
2.2.3.5.1	<i>Toxizität</i>	28
2.2.3.5.2	<i>Allergische Reaktionen</i>	29
2.2.3.5.3	<i>Sonstige Nebenwirkungen</i>	30
2.2.3.5.4	<i>Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten</i>	31
<b>2.2.4</b>	<b>Cephalosporine in der Veterinärmedizin</b>	<b>32</b>
<b>2.3</b>	<b>Cephalosporin-Rückstände in Milch</b>	<b>35</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Hemmstoffe in der Milch</b>	<b>35</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Ursachen von Cephalosporin-Rückständen in Milch</b>	<b>36</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Gesetzliche Bestimmungen und Richtlinien</b>	<b>38</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Toxikologische Bedeutungen und gesundheitliche Risiken</b>	<b>41</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Lebensmitteltechnologische Bedeutung</b>	<b>42</b>

<b>2.4</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	43
<b>2.4.1</b>	<b>Mikrobiologische Verfahren</b>	44
2.4.1.1	Agar-Diffusions-Verfahren	44
2.4.1.1.1	<i>Blättchentest</i>	45
2.4.1.1.2	<i>Tests mit Redoxindikator</i>	45
2.4.1.1.3	<i>Tests mit pH-Indikator</i>	46
<b>2.4.2</b>	<b>Rezeptor-Bindungstests</b>	49
<b>2.4.3</b>	<b>Enzymatische Tests</b>	50
<b>2.4.4</b>	<b>Immunochemische Verfahren</b>	51
2.4.4.1	Fluoreszenzimmunoassay (FIA)	53
2.4.4.2	Enzymimmunoassay (EIA)	54
2.4.4.3	Kombinierte Verfahren	59
<b>2.4.5</b>	<b>Physikalisch-chemische Verfahren und elektrochemische Verfahren</b>	61
2.4.5.1	Chromatographische Verfahren	61
2.4.5.1.1	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i>	62
2.4.5.1.2	<i>Flüssigkeitschromatographie (LC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS)</i>	62
2.4.5.2	Elektrochemische und sonstige Verfahren	66
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	67
<b>3.1</b>	<b>Material und Geräte</b>	67
<b>3.1.1</b>	<b>Chemikalien und Biochemika</b>	67
<b>3.1.2</b>	<b>Antibiotika und Penicillinase</b>	68
<b>3.1.3</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	69
<b>3.1.4</b>	<b>Immunreagenzien</b>	69
<b>3.1.5</b>	<b>Versuchstiere</b>	70
<b>3.1.6</b>	<b>Probenmaterial</b>	70
<b>3.1.7</b>	<b>Geräte</b>	70
<b>3.1.8</b>	<b>Sonstige Materialien</b>	71

<b>3.2</b>	<b>Methodik</b>	72
<b>3.2.1</b>	<b>Herstellung der Immunreagenzien</b>	72
3.2.1.1	Herstellung der Cephalosporin-Konjugate	72
3.2.1.1.1	<i>Kopplung von Cefalexin bzw. Ceftiofur an KLH</i>	72
3.2.1.1.2	<i>Kopplung von Ceftiofur an BSA</i>	72
3.2.1.1.3	<i>Kopplung von Cefalexin bzw. Ceftiofur an HRP</i>	73
3.2.1.1.4	<i>Charakterisierung der Konjugate</i>	75
3.2.1.2	Gewinnung spezifischer Antiseren	76
3.2.1.2.1	<i>Immunisierung</i>	76
3.2.1.2.2	<i>Serumgewinnung</i>	77
3.2.1.2.3	<i>Überprüfung des Immunisierungsverlaufs</i>	77
3.2.1.2.4	<i>Auswahl der am besten geeigneten Antiseren</i>	78
3.2.1.2.5	<i>Aufbereitung der Antiseren</i>	79
<b>3.2.2</b>	<b>Herstellung der Antibiotika-Standards</b>	80
<b>3.2.3</b>	<b>Herstellung der Ceftiofur-Derivate</b>	80
3.2.3.1	Derivatisierung von Ceftiofur zu DFC und DFA	80
3.2.3.2	Überprüfung der Derivatisierungen	81
<b>3.2.4</b>	<b>Erstellung und Charakterisierung enzymimmunologischer Nachweisverfahren für CEFALEXIN</b>	83
3.2.4.1	Kompetitiver direkter simultaner EIA (Beschichtung mit Antiserum)	83
3.2.4.1.1	<i>Durchführung</i>	83
3.2.4.1.2	<i>Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems</i>	84
3.2.4.1.3	<i>Spezifität des Testsystems</i>	85
3.2.4.2	Kompetitiver direkter simultaner EIA (DASP-Technik)	85
3.2.4.2.1	<i>Durchführung</i>	86
3.2.4.2.2	<i>Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems</i>	86
3.2.4.2.3	<i>Spezifität des Testsystems</i>	87
<b>3.2.5</b>	<b>Erstellung und Charakterisierung enzymimmunologischer Nachweisverfahren für CEFTIOFUR</b>	87
3.2.5.1	Kompetitiver indirekter EIA (Beschichtung mit Antigen)	87
3.2.5.1.1	<i>Durchführung</i>	88
3.2.5.1.2	<i>Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems</i>	88
3.2.5.1.3	<i>Spezifität des Testsystems</i>	90
3.2.5.2	Kompetitiver direkter simultaner EIA (DASP-Technik)	90

<b>3.2.6</b>	<b>Versuche zur Anwendbarkeit der entwickelten EIAs</b>	91
3.2.6.1	Nachweis von CEFALEXIN in künstlich kontaminierter Milch	91
3.2.6.1.1	<i>Künstliche Kontaminierung und Probenvorbereitung</i>	91
3.2.6.1.2	<i>Durchführung der EIAs zum Nachweis von Cefalexin</i>	91
3.2.6.1.3	<i>Auswertung der EIAs zum Nachweis von Cefalexin</i>	92
3.2.6.2	Nachweis von CEFTIOFUR in künstlich kontaminierter Milch	92
3.2.6.2.1	<i>Künstliche Kontaminierung und Probenvorbereitung</i>	92
3.2.6.2.2	<i>Durchführung der EIAs zum Nachweis von Ceftiofur</i>	92
3.2.6.2.3	<i>Auswertung der EIAs zum Nachweis von Ceftiofur</i>	93
3.2.6.3	Nachweis von CEFTIOFUR in hemmstoffpositiver Anlieferungsmilch	93
3.2.6.3.1	<i>Vorberichte zu den Milchproben</i>	93
3.2.6.3.2	<i>Untersuchung mittels mikrobiologischer Tests, Rezeptor-Bindungstests und EIAs</i>	94
3.2.6.3.3	<i>Untersuchung mittels EIAs zum Nachweis von Ceftiofur</i>	94
3.2.6.4	Nachweis von CEFTIOFUR in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation	95
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	96
<b>4.1</b>	<b>Herstellung der Immunreagenzien</b>	96
<b>4.1.1</b>	<b>Herstellung der Protein-Konjugate</b>	96
<b>4.1.2</b>	<b>Gewinnung spezifischer Antiseren</b>	101
4.1.2.1	Immunisierungsverlauf	101
4.1.2.2	Auswahl der am besten geeigneten Antiseren	104
<b>4.2</b>	<b>Herstellung der Ceftiofur-Derivate und Hydrolyse von Ceftiofur bzw. Cefalexin</b>	104
<b>4.3</b>	<b>Enzymimmuntests</b>	105
<b>4.3.1</b>	<b>EIAs zum Nachweis von CEFALEXIN</b>	105
4.3.1.1	Kompetitiver direkter simultaner EIA zum Nachweis von Cefalexin	105
4.3.1.1.1	<i>Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems</i>	105
4.3.1.1.2	<i>Spezifität des Testsystems</i>	108
4.3.1.2	Kompetitiver direkter simultaner EIA zum Nachweis von Cefalexin (DASP)	110
4.3.1.2.1	<i>Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems</i>	110
4.3.1.2.2	<i>Spezifität des Testsystems</i>	113

4.3.1.3	Vergleich der kompetitiven direkten simultanen EIAs zum Nachweis von Cefalexin in verschiedenen Testaufbauten	114
<b>4.3.2</b>	<b>EIAs zum Nachweis von CEFTIOFUR</b>	115
4.3.2.1	Kompetitiver indirekter EIA zum Nachweis von Ceftiofur	115
4.3.2.1.1	<i>Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems</i>	115
4.3.2.1.2	<i>Spezifität des Testsystems</i>	118
4.3.2.2	Kompetitiver direkter simultaner EIA zum Nachweis von Ceftiofur (DASP)	121
<b>4.3.3</b>	<b>Anwendbarkeit der entwickelten EIAs</b>	121
4.3.3.1	Nachweis von CEFALEXIN in künstlich kontaminierter Milch	121
4.3.3.2	Nachweis von CEFTIOFUR in künstlich kontaminierter Milch	121
4.3.3.3	Nachweis von CEFTIOFUR in hemmstoffpositiver Anlieferungsmilch	124
4.3.3.4	Nachweis von CEFTIOFUR in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation	126
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	128
<b>5.1</b>	<b>Herstellung der Immunreagenzien</b>	130
<b>5.1.1</b>	<b>Herstellung der Protein-Konjugate</b>	130
<b>5.1.2</b>	<b>Gewinnung spezifischer Antiseren und Immunisierungsverlauf</b>	131
<b>5.2</b>	<b>Herstellung der Ceftiofur-Derivate</b>	132
<b>5.3</b>	<b>Entwicklung und Anwendung der EIAs</b>	132
<b>5.3.1</b>	<b>EIAs zum Nachweis von CEFALEXIN</b>	133
<b>5.3.2</b>	<b>EIAs zum Nachweis von CEFTIOFUR</b>	134
<b>5.3.3</b>	<b>Anwendbarkeit der entwickelten EIAs</b>	135
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	138
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	140

<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	142
<b>8.1</b>	<b>Zitierte Rechtsvorschriften</b>	212
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	215
<b>10</b>	<b>ANHANG</b>	219

# 1 EINLEITUNG

Durch den Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Tiermedizin ist die Gefahr von Rückständen dieser Substanzen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Milch) gegeben (MALISCH, 1986; MCINTOSH, 1986; SUHREN *et al.*, 1990; JÜLICHER, 1992; MOATS, 1996; SCHWARZ und WERCKENTHIN, 2001). Sie stellen ein potentielles Risiko für die Gesundheit des Verbrauchers dar und können zudem infolge von Produktionsstörungen bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel („Hemmstoffe“) hohe wirtschaftliche Verluste in der Milch- und Lebensmittelindustrie verursachen (MARTH und ELLICKSON, 1959; TERPLAN und ZAADHOF, 1967; ALLISON, 1985; MCINTOSH, 1986; SCHÄLLIBAUM, 1986a; BRADY und KATZ, 1988; JONES und SEYMOUR, 1988; SEYMOUR *et al.*, 1988b; MITCHELL *et al.*, 1995; MORETAIN und FROGER, 1995; SISCHO, 1996; SUHREN, 1996; HONKANEN-BUZALSKI und SUHREN, 1999; GRUNWALD *et al.*, 2001).

Zum Schutze des Verbrauchers sowie zur Harmonisierung der Rechtsnormen innerhalb der EU wurden im Rahmen der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 Rückstandshöchstmengen (maximum residue limits = MRLs) für die zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Stoffe in Nahrungsmittel tierischen Ursprungs festgelegt.

Zur Einhaltung dieser Höchstmengen ist aufgrund lebensmittelrechtlicher Vorschriften eine Prüfung auf Tierarzneimittel-Rückstände (Antiinfektiva) und im Sinne einer guten Molkereipraxis eine lückenlose Rückstandskontrolle der Milch erforderlich. Die am häufigsten in hemmstoffpositiver Anlieferungs- bzw. Sammelmilch nachgewiesenen Antibiotika stellen nach wie vor die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika dar (MCINTOSH, 1986; MORETAIN und FROGER, 1995; SUHREN *et al.*, 1996a; SUHREN und REICHMUTH, 1998b; MPR 2003, Tätigkeitsbericht 2002). Neben den nach wie vor wichtigen Penicillinen gewinnen die Cephalosporine aufgrund ihres breiteren Wirkungsspektrums zunehmend an Bedeutung, beide gehören national wie international zu den in der Mastitistherapie und -prophylaxe am häufigsten eingesetzten Arzneimitteln (IDF, 1983; SUHREN und HEESCHEN, 1987a; KINDRED und HUBBERT, 1993; SUNDLOF *et al.*, 1995; ZOMER *et al.*, 1995; KLUGE, 1998; MITCHELL *et al.*, 1998; KROKER, 1999; PETRAUSCH Lila Liste, 2004; ZWALD *et al.*, 2004).

In den letzten Jahren wurden verschiedene kommerzielle Schnelltestsysteme für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika entwickelt. Die Testsensitivität dieser Testsysteme ist zwar meist ausreichend (LITZ, 1995; KROLL, 2000; KROLL *et al.*, 2000), allerdings lassen diese Methoden nur bedingt eine Identifizierung und Quantifizierung der vorhandenen Wirkstoffe zu. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren (BOISON, 1992; MITCHELL *et al.*, 1998; SCHENCK und CALLERY, 1998) andererseits sind wegen des hohen apparativen, personellen und zeitlichen Aufwandes für den Routineeinsatz nicht geeignet (BYGRAVE *et al.*, 1995). Enzymimmunologische Verfahren dagegen zeichnen sich durch hohe Sensitivität bei schneller und einfacher Durchführung aus und gewinnen in der Lebensmittelhygiene zunehmend an Bedeutung (NEWSOME, 1986; STANKER und BEIER, 1996; SPINKS, 2000; FRANEK und HRUSKA, 2005).

Im Rahmen der Entwicklung eines integrierten Nachweis- und Differenzierungssystems ermöglicht die Nutzung verschiedener Methoden bzw. Methodenkombinationen (mikrobiologische Tests, Rezeptor-Bindungstests, Enzymimmuntests), eine einfache und flexible Analyse von Antibiotikarückständen in Milch (HEESCHEN, 1993; SUHREN *et al.*, 1994; ANONYM, 1996; HEESCHEN und SUHREN, 1996; SUHREN *et al.*, 1996b; USLEBER *et al.*, 2000; HOLTKÖTTER *et al.*, 2002, SUHREN, 2002a+b; KERP *et al.*, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, enzymimmunologische Verfahren für zwei in der Veterinärmedizin bedeutsame Cephalosporine zu entwickeln, zum einen für Cefalexin und zum anderen für Ceftiofur. Da für Ceftiofur neben der Muttersubstanz insbesondere auch der Hauptmetabolit Desfuroylceftiofur (DFC) von analytischem Interesse ist, sollte dieses Abbauprodukt möglichst miterfasst werden.

## **2            SCHRIFFTUM**

### **2.1            Cephalosporine**

#### **2.1.1          Allgemeines**

Antimikrobiell wirksame Substanzen aus Schimmelpilzen wurden nach verschiedenen Berichten wohl schon um 1000 v. Chr. in China eingesetzt. Dort wurde schimmeliger Sojabrei zur Wundbehandlung verwendet (MOL, 1975; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNCKE, 1996). Der neuzeitliche, gezielte Einsatz von Antibiotika begann mit Alexander FLEMING, der 1928/1929 die antimikrobielle Wirkung eines unabsichtlich auf eine Kulturplatte gelangten Schimmelpilzes (*Penicillium notatum*) beobachtete. Die antimikrobiell wirksame Substanz erhielt den Namen Penicillin (KROKER *et al.*, 1996; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNCKE, 1996; NOSEK *et al.*, 1997; SYKES, 2001). Durch Pionierarbeiten von Florey, Chain, Heatley, Abraham und anderen Wissenschaftlern wurden weitere Penicilline isoliert, synthetisiert und klinisch eingesetzt (MOL, 1975; ABRAHAM, 1983; KROKER *et al.*, 1996; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNCKE, 1996; NOSEK *et al.*, 1997). Nach Isolation einer anderen antimikrobiell wirksamen Substanz (Cephalosporin C) begann die Herstellung von Cephalosporinen (NEWTON und ABRAHAM, 1956; HALE *et al.*, 1961; ABRAHAM, 1983; ADAM und CHRIST, 1987; NOSEK *et al.*, 1997; ROLINSON, 1998; BIJEV *et al.*, 1999).

Penicillinen und Cephalosporinen gemeinsam ist die für die antibakterielle Wirkung entscheidende  $\beta$ -Laktamringstruktur, so dass sie auch als  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bezeichnet werden. Von Bakterien produzierte Laktamasen können das  $\beta$ -Laktamringsystem hydrolytisch spalten, was zum Verlust der antimikrobiellen Wirkung des Antibiotikums führt (KROKER *et al.*, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000).

#### **2.1.2          Geschichte der Cephalosporine**

1948 veröffentlichte Giuseppe BROZZU in Sardinien seine Arbeiten über die Isolierung Antibiotika-produzierender Kulturen des Pilzes *Cephalosporium acremonium* aus Abwässern. Zur Reinigung des Materials schickte er Proben zu der Arbeitsgruppe Howard Florey nach Oxford. Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass *Cephalosporium acremonium* (heutiger Name: *Acremonium chrysogenum*) mehrere antimikrobiell wirksame Substanzen produziert, von denen später eine Substanz als

Penicillin N identifiziert wurde (ABRAHAM und NEWTON, 1961a; HOU und POOLE, 1971; DEMAINE und ELANDER, 1999; HAMILTON-MILLER, 2000). 1955 gelang es NEWTON und ABRAHAM, eine weitere antimikrobiell wirksame Substanz aus dem Kulturfiltrat des Pilzes isolieren, das Cephalosporin C (NEWTON und ABRAHAM, 1956; HOU und POOLE, 1971; ABRAHAM, 1983; ADAM und CHRIST, 1987; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNKE, 1996; NOSEK *et al.*, 1997; DEMAINE und ELANDER, 1999). 1961 wurde die Struktur dieser Substanz aufgeklärt (ABRAHAM und NEWTON, 1961a+b; HODGKIN und MASLEN, 1961).

Die chemische Herstellung von Cephalosporinen, ausgehend von Penicillin G bzw. V durch Ringerweiterung führte 1963 zur Synthese von Cefalexin durch MORIN und Mitarbeiter (GRÄFE, 1992). Durch die Weiterentwicklung der fermentativen Herstellung von Cephalosporin C (SMITH *et al.*, 1967; DEMAINE und ELANDER, 1999) und durch Entfernung der Seitenkette gelang es die 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) technisch herzustellen (LODER *et al.*, 1961; MORIN *et al.*, 1962; MORIN *et al.*, 1969; ADAM und CHRIST, 1987; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNKE, 1996). Darüber hinaus wurden die von *Streptomyces*-Arten gebildeten sogenannten Cephamicine entdeckt (O'CALLAGHAN, 1979; ADAM und CHRIST, 1987; GRÄFE, 1992).

Derivatisierungen an verschiedenen Ringpositionen führten zur Entwicklung einer Vielzahl neuer Substanzen. Wesentliche Zielsetzungen bei der Cephalosporinentwicklung waren sowohl die Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit (z.B. breites Wirkungsspektrum,  $\beta$ -Laktamase-Stabilität) als auch die Verbesserung des pharmakologischen Profils (z.B. verbesserte orale Absorption, verlängerte Halbwertszeit) (HALE *et al.*, 1961; GRÄFE, 1992; HARBRIDGE *et al.*, 1995; OBI *et al.*, 1995; BIJEV *et al.*, 1999; HAMILTON-MILLER, 1999; LEE *et al.*, 1999; FEKNER *et al.*, 2000; NEWMAN *et al.*, 2000).

## **2.2 Charakterisierung der Cephalosporine**

### **2.2.1 Struktur und Einteilung der Cephalosporine**

Die Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist chemisch durch ihr gemeinsames Grundgerüst, den  $\beta$ -Laktamring, gekennzeichnet und umfasst die Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme (DÜRCKHEIMER *et al.*, 1985; BRANDER *et al.*, 1991; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001).

Grundstruktur der Penicilline ist ein  $\beta$ -Laktamring, verbunden mit einem Thiazolidinring (Abbildung 2.1). Kennzeichnend ist die 6-Aminopenicillansäure (6-APS), das gemeinsame Grundgerüst aller Penicilline (HOU und POOLE, 1971; ROLINSON, 1979; LUENGO, 1995; DEMAINE und ELANDER, 1999; PRESCOTT *et al.*, 2000).

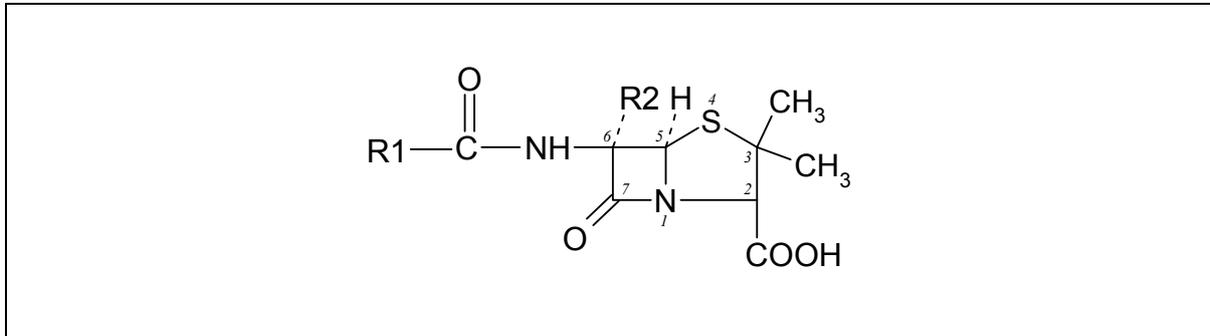


Abbildung 2.1: Grundgerüst der Penicilline

Cephalosporine besitzen anstelle des fünfgliedrigen Thiazolidinringes der Penicilline einen sechsgliedrigen Dihydrothiazinring (Abbildung 2.2). Die 7-ACS ist das gemeinsame Grundgerüst aller Cephalosporine (ADAM und CHRIST, 1987; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNKE, 1996) und Ausgangssubstanz zur Darstellung vieler halbsynthetischer Cephalosporine (ABRAHAM und NEWTON, 1965; NEWTON und HAMILTON-MILLER, 1967; WEBBER *et al.*, 1969; MOL, 1975; WEBBER *et al.*, 1975; ROLINSON, 1979; ABRAHAM, 1983; ADAM und CHRIST, 1987; NOSEK *et al.*, 1997; ROLINSON, 1998; DUTTA *et al.*, 2004). Wie bei den Penicillinen unterscheidet man auch hier je nach Seitenkettenderivatisierung zwischen natürlichen Cephalosporinen (z.B. Cephalosporin C) und halbsynthetischen Cephalosporinen (z. B. Cefalexin, Cefotiofur) (ADAM und CHRIST, 1987; KROKER *et al.*, 1996; ROLINSON, 1998; DEMAINE und ELANDER, 1999; STAHLMANN und LODE, 2001).

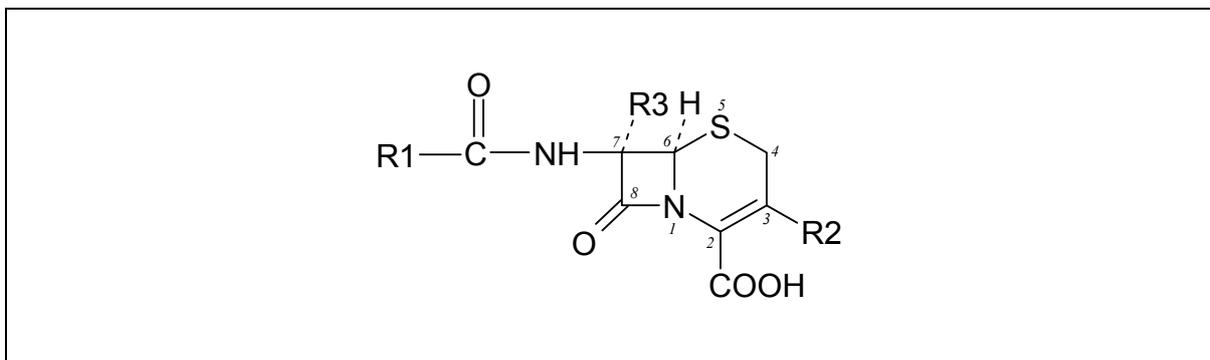


Abbildung 2.2: Grundgerüst der Cephalosporine

Die Einteilung der Cephalosporine kann unter verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. Aus klinisch-therapeutischer Sicht bietet sich eine Differenzierung in parenteral zu verabreichende Wirkstoffe mit oder ohne  $\beta$ -Laktamase-Stabilität und in Oralcephalosporine an (Abbildung 2.3), während pharmakologisch eine Einteilung in verschiedene „Generationen“ in Abhängigkeit von ihrem Wirkungsspektrum erfolgen kann (KROKER *et al.*, 1996). Die häufig benutzte Einteilung in drei oder sogar vier Generationen ist jedoch nicht einheitlich definiert (STAHLMANN und LODE, 2001). Zudem kann eine Klassifizierung nach Entstehung bzw. Entwicklungsgrad oder nach chemischer Strukturformel erfolgen (GRÄFE, 1992). Im Folgenden wird die Einteilung nach Generationen näher erläutert.

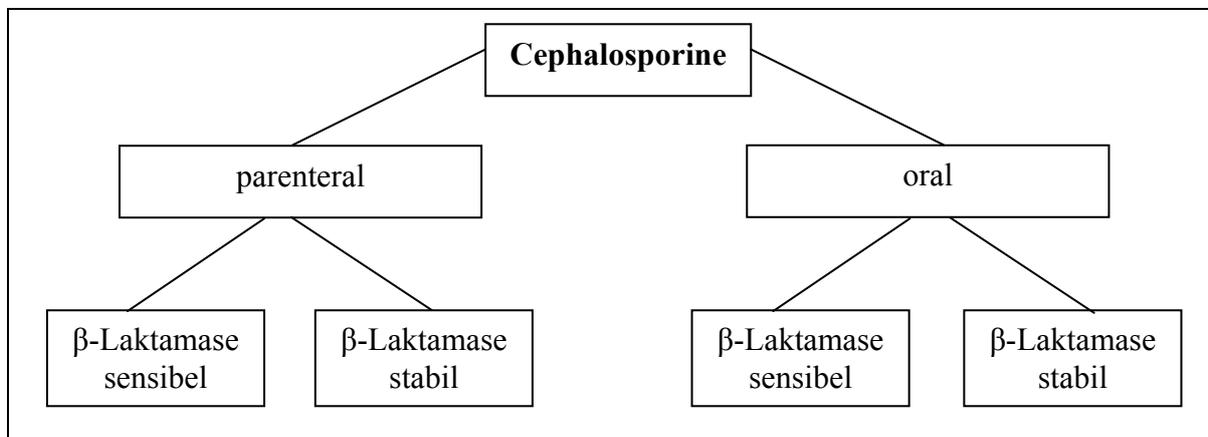


Abbildung 2.3: Vorschlag zur Einteilung der Cephalosporine (ADAM und CHRIST, 1987; GRÄFE, 1992)

### Einteilung der Cephalosporine nach Generationen

(nach ADAM und CHRIST, 1987; DÜRCKHEIMER *et al.*, 1985; DÜRCKHEIMER *et al.*, 1988; GRÄFE, 1992; KROKER *et al.*, 1996, KROKER, 1999; HORNISH und KOTARSKI, 2002)

#### 1. Generation:

Die Vertreter dieser Gruppe besitzen Wirksamkeit gegen grampositive Keime (*Staphylococcus (S.) aureus*, Streptokokken) und zum Teil auch gegen gramnegative Erreger (*Escherichia (E.) coli*, Klebsiellen, Pasteurellen, Salmonellen). Meist haben sie nur eine eingeschränkte  $\beta$ -Laktamase-Stabilität. Sie sind parenteral (z.B. Cefalothin, Cefazolin, Cefacetril, Cefaloridin) oder oral (z.B. Cefaloglycin, Cefalexin, Cefapirin, Cefadroxil, Cephradin, Cefaclor) applizierbar. Das in der Veterinärmedizin verwendete Cefalonium wird lokal (Euter, Auge) eingesetzt (EMEA, 2002b).

## 2. Generation:

Die Vertreter dieser Gruppe besitzen breite Wirksamkeit sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Erreger. Verglichen mit der ersten Generation weisen sie eine stärkere Wirkung im gramnegativen Bereich (gegen *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*) auf und sind relativ  $\beta$ -Laktamase-stabil. Hierzu gehören die Aminothiazolyl-Cephalosporine und das zu den Cephamyocinen gehörende 7-Methoxy-Cephalosporin Cefoxitin. Beispiele für die vorwiegend parenteral zu verabreichenden Cephalosporine dieser Gruppe sind Cefmandol, Cefuroxim, Cefoxitin und Cefotiam.

## 3. Generation:

Die Vertreter dieser Gruppe besitzen ebenfalls Wirksamkeit im grampositiven und gramnegativen Erregerbereich, besonders gegen *Pseudomonas* und *Acinetobacter*. Zudem weisen sie meist eine hohe  $\beta$ -Laktamase-Stabilität auf. N-acetylierte Phenylglycin-Cephalosporine mit Thiazinsubstituenten am Ring zählen zu dieser Gruppe. Die Substanzen dieser Gruppe sind i.A. parenteral zu verabreichen. Einige Vertreter dieser Gruppe sind Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefsulodin, Ceftazidim, Cefodizim, Latamoxef sowie die auch in der Veterinärmedizin eingesetzten Substanzen Cefoperazon und Ceftiofur.

## 4. Generation:

Die Vertreter dieser Gruppe, wie beispielsweise Cefpirom und Cefepim, besitzen eine breite Aktivität. Sie wirken gegen grampositive Erreger wie Staphylokokken und zusätzlich besonders gegen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die in der Veterinärmedizin eingesetzte Substanz Cefquinom wird eher der 4. Generation zugerechnet (HORNISH und KOTARSKI, 2002).

Von SCHOLZ und NABER und einer Expertengruppe der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG) wurde 1999 eine Einteilung der Cephalosporine nach ihrer chemischen Struktur vorgeschlagen. Die 1. Gruppe umfasst die Glycyl-Cephalosporine, wozu z.B. Cefaclor, Cefadroxil, Cefalexin, Cefprozil sowie Loracarbef (als erster Vertreter der oralen Carbapeneme) zählen. Die 2. Gruppe beinhaltet die Aminothiazol/Oxim-Cephalosporine wie z.B. Cefixim, Cefibuten, Cefetamet und Cefpodoxim. Zur 3. Gruppe gehören die Pro-Drug-Cephalosporine (2.2.3.4.1), wie Cefuroximaxetil, Cefpodoximproxetil und Cefetametpivoxil. Des Weiteren wird vorgeschlagen, die Oralcephalosporine unter primärer Berücksichtigung des antibakteriellen Spektrums in drei Gruppen einzuteilen, wobei die Reihenfolge innerhalb einer Gruppe die ansteigende

*in vitro*-Aktivität auf der Grundlage der minimalen Hemmkonzentration in Bezug zu den bei den Hauptindikationen vorkommenden Erregern verdeutlichen soll (SCHOLZ und NABER, 2000). Oralcephalosporine der 1. Gruppe (z.B. Cefalexin, Cefadroxil, Cefaclor) haben keine oder nur eine eingeschränkte Aktivität gegen *Haemophilus (H.) influenzae*. Oralcephalosporine der 2. Gruppe (z.B. Cefprozil, Loracarbef) wirken gegen *H. influenzae* und andere bakterielle Atemwegs-, Haut-, Weichteil- und Harnwegsinfektionserreger. Oralcephalosporine der 3. Gruppe (z.B. Cefibuten, Cefixim) haben eine höhere Aktivität und ein breiteres Spektrum gegen gramnegative Erreger als die Gruppe 2. Auch diese Einteilung ist nicht unumstritten und wird diskutiert (SHAH, 2001; SCHOLZ, 2001).

### **2.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften**

Cephalosporine sind polare und wasserlösliche Verbindungen (ROUAN, 1985), die unterschiedlichen Seitenketten beeinflussen die Löslichkeit der Cephalosporine. So sind die meisten Cephalosporine als Natrium- oder Kalium-Salze in Wasser, wässrigen Lösungen und schwachen Laugen (0,1 mol/l NaOH) gut löslich, während sie in organischen Lösungsmitteln nur gering (z.B. in Alkoholen) oder schwer (z.B. in unpolaren Lösungsmitteln wie Ether) löslich sind (HOU und POOLE, 1971; HORNISH und KOTARSKI, 2002; THOMSON, 2003).

$\beta$ -Laktam-Antibiotika können monobasisch oder als Zwitterion vorliegen, was ihre Stabilität in Lösungen beeinflusst. Das Stabilitätsoptimum von monobasischen Substanzen (wie Penicillin G) liegt in wässrigen Lösungen bei einem pH-Wert von 6 - 7 und bei Zwitterionen an deren isoelektrischem Punkt, z.B. bei Cefalexin und Cephaloglycin bei einem pH-Wert von 4,5 (GRIFFITH und BLACK, 1970; HOU und POOLE, 1971; NIGHTINGALE *et al.*, 1975; KROKER *et al.*, 1996). Temperatur und pH-Wert beeinflussen die Zersetzung von Cephalosporinen. Art und Anzahl der Abbauprodukte sind verschieden, neben Ringspaltungen können Umlagerungen, Ausbildung innerer Ester oder Spaltprodukte auftreten (JEFFERY *et al.*, 1960; HALE *et al.*, 1961; LODER *et al.*, 1961; HOU und POOLE, 1971; PIKAL *et al.*, 1977; THOMA, 1993). Der  $\beta$ -Laktamring kann im sauren und alkalischen Milieu hydrolytisch gespalten werden, was mit dem Verlust der antimikrobiellen Aktivität einhergeht (HOU und POOLE, 1971; KROKER *et al.*, 1996).

Die Stabilität der Cephalosporine, sowohl im sauren und alkalischen Milieu als auch gegen enzymatische Hydrolyse (Angriff durch von verschiedenen Bakterien gebildeten Enzyme:  $\beta$ -Laktamasen, z.B. Penicillinasen, Cephalosporinasen) wird zudem durch die Seitenketten beeinflusst (INDELICATO *et al.*, 1974a; BOYD *et al.*, 1975; BUNDGAARD, 1975; INDELICATO *et al.*, 1977; SCHANCK *et al.*, 1983). Im Vergleich zu den Penicillinen sind Cephalosporin C und Analoga relativ Penicillinase-stabil und säurefest (NEWTON und ABRAHAM, 1955; ABRAHAM und NEWTON, 1956; CHAUVETTE *et al.*, 1962; CROMPTON *et al.*, 1962; MORIN *et al.*, 1962; HOU und POOLE, 1971; ADAM und CHRIST, 1987; HAMILTON-MILLER, 2000; THOMSON, 2003).

Cephalosporine werden in ähnlicher Weise von nukleophilen Reagenzien angegriffen wie die Penicilline, das entsprechende Zersetzungsprodukt ist im Gegensatz zu der Penicilloylsäure („penicilloic acid“) instabil und zersetzt sich weiter in wässrigen Lösungen (SCHWARTZ und BUCKWALTER, 1962; ABRAHAM und NEWTON, 1965; NEWTON und HAMILTON-MILLER, 1967; NEWTON *et al.*, 1967; HAMILTON-MILLER *et al.*, 1970b; HOU und POOLE, 1971; HEWITT, 1973; PETZ, 1978; ABRAHAM, 1983; ROMANO *et al.*, 2000a; BLANCA GOMEZ *et al.*, 2004).

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Cephalosporine genauer besprochen. Das Molekulargewicht von Cefalexin (D-7-(2-amino-2-phenylacetamido)-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid; Abbildung 2.5) liegt bei 347,4 und die Summenformel lautet  $C_{16}H_{17}N_3O_4S$  (THOMSON, 2003). Die Zersetzung von Cefalexin, einem Cephalosporin mit einer Methylgruppe am C3-Atom und einer Aminogruppe in der Seitenkette am C7-Atom, in Wasser kann hydrolytisch und durch intramolekulare Aminolyse erfolgen, der jeweilige Anteil ist vom pH-Wert abhängig. Von verschiedenen Autoren werden verschiedene Zersetzungsmechanismen und -produkte, so zum Beispiel zu Piperazin-, Piperazindion- und Thiophenon-Derivaten beschrieben (GRIFFITH und BLACK, 1970; BUNDGAARD, 1975; BUNDGAARD, 1976a+b; YAMANA und TSUJI, 1976; DINNER, 1977; FOGG *et al.*, 1979; LI und CHEN, 1993; HENDRIKSEN *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1999; TSANG *et al.*, 2004).

Das Molekulargewicht von Ceftiofur (6R,7R-7[(2-amino-4-thiazolyl)-Z-(methoxyimino)acetyl]amino)-3-[(2-furanylcarbonyl)thio]methyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo-[4.2.0] oct-2-ene-2-carboxylat; Abbildung 2.5) liegt bei 523,6 und die Summenformel lautet  $C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$  (THOMSON, 2003). Ceftiofur wird sowohl unter sauren als auch unter basischen Reaktionsbedingungen rasch zersetzt (GILBERTSON *et al.*, 1990; HORNISH

und KOTARSKI, 2002). Beim Abbau von Ceftiofur (KOSHY und CAZERS, 1997; KOTARSKI *et al.*, 2002) entstehen mehrere verschiedene Derivate mit zum Teil antibiotischer Wirkung (soweit der  $\beta$ -Laktamring erhalten bleibt) wie z.B. der Metabolit DFC, der aus Ceftiofur durch Abspaltung von Furansäure entsteht (Abbildung 2.4). Die Bildung von DFC ist am größten (65 %) im alkalischen Milieu (pH 10) verglichen mit saurem (pH 1; pH 3; pH 5) und neutralem (pH 7,4; destilliertes Wasser) Milieu. Die Zersetzungsrate steigt in allen wässrigen Lösungen mit Erhöhung der Inkubationstemperatur (GILBERTSON, *et al.*, 1990; EMEA, 1999a; SUNKARA *et al.*, 1999; PHARMACIA UPJOHN GmbH, Gebrauchsinformation Excenel<sup>®</sup> RTU Stand 2000).

In wässrigen Lösungen zeigen Cephalosporine und ihre Salze typische UV-Absorption im Bereich von 260 nm (Cefalexin  $\lambda_{\max}$  262 nm; Ceftiofur  $\lambda_{\max}$  293 nm; Abbildung 3.1), welches auf die O=C-N-C=C- Struktur unter möglicher Beteiligung des Schwefelatoms zurückzuführen ist (CHAUVETTE *et al.*, 1962; MORIN *et al.*, 1963; HOU und POOLE, 1971; ABRAHAM, 1983; ROUAN, 1985; GALLO MARTÍNEZ *et al.*, 2002). Eine Öffnung des  $\beta$ -Laktamringsystems, beispielsweise durch Aminolyse bzw. enzymatische Hydrolyse, führt zur Veränderung des Absorptionsverhaltens (ABRAHAM und NEWTON, 1965; NEWTON und HAMILTON-MILLER, 1967; NEWTON *et al.*, 1967; HAMILTON-MILLER *et al.*, 1970a+b; LI und CHEN, 1993).

### 2.2.3 Biologische Eigenschaften

Da Cephalosporine sowohl an der Cephem-Position als auch an der Amino-Position derivatisiert werden können, bieten sie bessere Möglichkeiten zu strukturellen Modifikation. Die Substitution verschiedener Reste (R1, R2 und R3; Abbildung 2.2) der 7-ACS resultiert in semisynthetischen Derivaten mit unterschiedlichen Eigenschaften (HALE *et al.*, 1961; CHAUVETTE *et al.*, 1962; NEWTON und HAMILTON-MILLER, 1967; FOUNTAIN und RUSSELL, 1969; MORIN *et al.*, 1969; SWEET und DAHL, 1970; HAMILTON-MILLER und ABRAHAM, 1971; HOU und POOLE, 1971; INDELICATO *et al.*, 1974b; WEBBER *et al.*, 1975; HAMILTON-MILLER, 1976; O'CALLAGHAN, 1979; BOYD *et al.*, 1980; ABRAHAM, 1983; BOYD, 1983; KNOTHE und DETTE, 1983; NEU, 1983; ADAM und CHRIST, 1987; DÜRCKHEIMER *et al.*, 1988; BRANDER *et al.*, 1991; GRÄFE, 1992; THOMA, 1993; MIRANDA *et al.*, 1996; NEEFT

*et al.*, 1996; HAMILTON-MILLER, 1999; BIJEV *et al.*, 2000; PRESCOTT *et al.*, 2000; TSUSHIMA *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.* 2000a+b; YAMAMOTO *et al.*, 2001; BIJEV *et al.*, 2004). Ausführliche Erläuterungen zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden u.a. in Übersichten von NEU (1983), DÜRCKHEIMER *et al.* (1985 und 1988) und THOMA (1993) gegeben. Einzelne Aspekte werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

### 2.2.3.1 Antibiotisches Wirkprinzip

Die antibakterielle Aktivität der Cephalosporine ist direkt auf den fusionierten  $\beta$ -Laktam-Dihydrothiazinring zurückzuführen, eine Aufspaltung führt zum kompletten Verlust der antibakteriellen Aktivität unabhängig von den Seitenketten. Die freie Carboxylgruppe ist ebenfalls erforderlich, alle Derivatisierungen dort führten zu Substanzen mit geringerer oder keiner Aktivität (HOU und POOLE, 1971).

Angriffsziel der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind sogenannte Penicillin-bindende-Proteine (PBP) an der Innenseite der Bakterienwand (KROKER *et al.*, 1996). Die antimikrobielle Wirkung der  $\beta$ -Laktame beruht auf der Hemmung (durch Acylierung des aktiven Zentrums) dieser als bakterielle Peptidoglykansynthetasen funktionierenden Proteine (Transpeptidasen, Carboxypeptidasen, Transglycosidasen) und damit einer Störung der Peptidoglykanbiosynthese der Bakterienzellwand (WAXMAN und STROMINGER, 1983; LABISCHINSKI, 1992; MATSUHASHI, 1994; LESSEL, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001). Voraussetzung ist deshalb das Penetrationsvermögen der Cephalosporine durch die dicke Peptidoglykan-Teichonsäureschicht der grampositiven bzw. durch die dünne äußere Membran der gramnegativen Bakterien. Das Durchdringen der selektiv wirkenden, das dünnere Mureingerüst der gramnegativen Bakterien umhüllenden, äußeren Membran erfolgt dabei innerhalb der Porenkanäle passiv (KROKER *et al.*, 1996; STAHLMANN und LODE, 2001). Der Wirkungsmechanismus der Cephalosporine ist an die  $\beta$ -Laktamringstruktur geknüpft, indem diese unter Aufspaltung eine meist kovalente Bindung mit dem aktivem Zentrum der Mureinsynthetasen (= Peptidoglykansynthetasen) eingeht, so dass als Folge dieser Enzymhemmung die in der Wachstumsphase erfolgende Einlagerung von Glycosidsträngen in die Bakterienzellwand gestört ist. Die daraus resultierende Abnahme der Quervernetzung der Glykanstränge durch Peptidbrücken führt dazu, dass kein stabiles Peptidoglykangerüst aufgebaut werden

kann. Zellwanddefekte, Aktivierung zelleigener autolytischer Systeme und damit eine zunehmende Zellwandinstabilität führen letztendlich zur Zelllyse (bakteriozider Typ). Der Wirkmechanismus macht deutlich, dass nur proliferierende Bakterien betroffen sind und Cephalosporine für tierische Zellen, für die Mureinsynthetasen beim Aufbau der Zellmembran keine Rolle spielen, nicht zytotoxisch sind (KROKER *et al.*, 1996; LESSEL, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001).

#### 2.2.3.2 Wirkungsspektrum

Cephalosporine besitzen ein breites antibakterielles Wirkungsspektrum jedoch mit erheblichen individuellen Unterschieden. Teilweise haben sie ein breiteres Wirkungsspektrum als Penicilline, da sie eine Vielzahl gramnegativer Erreger miterfassen können (PETERSEN und GRAHAM, 1974; ADAM und CHRIST, 1987; GRÄFE, 1992).

Gemeinsames Merkmal der Cephalosporine ist eine mehr oder minder ausgeprägte  $\beta$ -Laktamase-Stabilität. So sind sie unempfindlicher gegenüber den von einigen Bakterien produzierten Penicillinasen (HOU und POOLE, 1971; GRÄFE, 1992), weshalb Cephalosporine bei Penicillin-resistenten Mikroorganismen durchaus wirksam sein können, wenn Penicilline ihre Wirksamkeit verloren haben (SPEIGHT *et al.*, 1972; ADAM und CHRIST, 1987; KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1989).

Das Wirkungsspektrum der Cephalosporine umfasst grampositive Erreger wie Streptokokken, Pneumokokken, Corynebakterien, Listerien, *Erysipelothrix*, Pasteurellen, *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Bacteriodes*, Fusobakterien, Spirochäten, Staphylokokken (bes. *S. aureus*) und substanzabhängig ebenfalls zahlreiche gramnegative Erreger u.a. *E. coli*, Klebsiellen und *Proteus*; zum Teil auch Bazillen, Clostridien, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* und Salmonellen (GRIFFITH und BLACK, 1970; WALKER und GONZALES, 1971; FINLAND, 1972; SCHEIDT *et al.*, 1972; SOLBERG *et al.*, 1972; SPEIGHT *et al.*, 1972; NIGHTINGALE *et al.*, 1975; KNOTHE und DETTE, 1983; ADAM und CHRIST, 1987; SOBACK *et al.*, 1987; KUMAR *et al.*, 1988; SILLEY und BREWSTER, 1988; LOUHI *et al.*, 1992; SCHITO *et al.*, 1994; BÖTTNER *et al.*, 1995; CULLMANN, 1995; SALMON *et al.*, 1995; SALMON *et al.*, 1996; THORNSBERRY und YEE, 1996; WATTS und SALMON, 1997; KROKER, 1999; MASON und KIETZMANN, 1999; ORDEN *et al.*, 1999; DESHPANDE *et al.*, 2000; PRESCOTT *et al.*, 2000;

SCHITO *et al.*, 2002; GUÉRIN-FAUBLÉE *et al.*, 2003; LEHTOLAINEN *et al.*, 2003; AARESTRUP *et al.*, 2004).

Grundsätzlich ohne Wirkung sind Cephalosporine bei zellwandlosen Bakterien (z.B. Mykoplasmen), obligat intrazellulär (z.B. Chlamydien) oder vorwiegend intrazellulär (z.B. *Salmonella typhi*) lebenden Bakterien und bei sehr langsam wachsenden Bakterien (z.B. Mykobakterien) (STAHLMANN und LODE, 2001).

Cefalexin ist ein Cephalosporin der ersten Generation mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien, z.B. Staphylokokken, Streptokokken und *E. coli* (EMEA, 1999b, VIRBAC GmbH, Produktinformation 2003). Cefalexin zeigt eine gewisse Stabilität gegenüber von Staphylokokken produzierten  $\beta$ -Laktamasen, aber nicht gegenüber analogen, von gramnegativen Keimen produzierten Enzymen (SPEIGHT *et al.*, 1972; BRANDER *et al.*, 1991; CP-PHARMA, Produktinformation 2001).

Ceftiofur wirkt bakterizid gegen Erreger von Atemwegsinfektionen wie *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* (*Mannheimia spp.*), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus (Str.) suis* und *H. somnus* sowie bei Erregern der interdigitalen Nekrobazillose (Panaritium) (YANCEY *et al.*, 1987; BROWN *et al.*, 1991a; ESPINASSE *et al.*, 1992; FDA, 1992; HALSTEAD *et al.*, 1992; JIM *et al.*, 1992; HANSEN *et al.*, 1993; HEWETT, 1994; WATTS *et al.*, 1994; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; SUSTRONCK *et al.*, 1995; WEISKOPF und KAUSCHE, 1995; BLACKALL *et al.*, 1996; CLARKE *et al.*, 1996; SALMON *et al.*, 1996; MORCK *et al.*, 1998; STANEK und KOFLER, 1998; KESLER und BECHTOL, 1999; WARD, 2001; HIBBARD *et al.*, 2002; FDA 2003; KAUSCHE und ROBB, 2003). Auch gegenüber einigen Erregern uteriner Infektionen (Pyrexia, Metritis, Endometritis) bei laktierenden Rindern wie z.B. *Arcanobacterium pyogenes* und *Fusobacterium necrophorum* besteht gute Wirksamkeit (SMITH *et al.*, 1998; SCHMITT *et al.*, 2000; CHENAULT *et al.*, 2001; DRILLICH *et al.*, 2001; SALMON und SCHMITT, 2001; DRILLICH *et al.*, 2003; RISCO und HERNANDEZ, 2003; CHENAULT *et al.*, 2004; SHELDON *et al.*, 2004). Zwar sind Mastitiserreger wie beispielsweise *S. aureus*, Streptokokken, *E. coli* und *K. pneumoniae* Ceftiofur-empfindlich (WATTS *et al.*, 1995; SALMON *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; DESHPANDE *et al.*, 2000; ERSKINE *et al.*, 2002a; ROSSITTO *et al.*, 2002; OLIVER *et al.*, 2004a+b), jedoch erscheint Ceftiofur als Mastitis-Therapeutikum in der empfohlenen Dosierung und Anwendungsdauer nur bedingt geeignet (ERSKINE *et al.*,

2002b; ROBERSON, 2003; OLIVER *et al.*, 2004a+b) bis wenig effektiv (ERSKINE *et al.*, 1996; OWENS *et al.*, 1999).

### 2.2.3.3 Resistenzentwicklung

Als wichtige Mechanismen der Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind Modifikation der PBP (und damit Beeinträchtigung der Affinität zahlreicher  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu ihren Zielenzymen), Beeinflussung des Penetrationsvermögens (verminderte Penetration der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien oder strukturelle Veränderungen der Zellwand) sowie die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen zu nennen (GRÄFE, 1992; NEU, 1992; LESSEL, 1996; PIDDOCK *et al.*, 1997; PITOUT *et al.*, 1997a; PRESCOTT *et al.*, 2000; SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001). So führt beispielsweise die Fähigkeit zur Bildung eines PBP zu Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA), die neben Methicillin auch gegen viele andere Antibiotika resistent (= multiresistent) sein können (LABISCHINSKI, 1992). Modifikation der Targets (veränderte PBP) kommt bei Pneumokokken vor, dort werden häufig qualitativ und quantitativ veränderte Bindeproteinmuster festgestellt (GRÄFE, 1992; PITOUT *et al.*, 1997a; MASON und KIETZMANN, 1999; SCHMITZ *et al.*, 2001).

Die Produktion bakterieller Enzyme, die den  $\beta$ -Laktamring hydrolytisch spalten können und somit zum Verlust der antimikrobiellen Wirkung des Antibiotikums führen (ABRAHAM und NEWTON, 1961a; KROKER *et al.*, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000), stellt den häufigsten Resistenzmechanismus dar (PIDDOCK *et al.*, 1997; THERRIEN und LEVESQUE, 2000). Sie kommen in einer Vielzahl von Isoenzymen vor (HEWITT, 1973; BUSH *et al.*, 1995; LESSEL, 1996; PITOUT *et al.*, 1997b; MEDINA *et al.*, 1998; THERRIEN und LEVESQUE, 2000; PRESCOTT *et al.*, 2000). Drei Haupttypen  $\beta$ -Laktam-inaktivierender Enzyme sind inzwischen bekannt:  $\beta$ -Laktamasen, Aminohydrolasen und Cephalosporin-Acetylerasen (GRÄFE, 1992). Bedeutsam sind v.a. die Penicillinasen (vorwiegend bei Staphylokokken) und die Cephalosporinasen (vorwiegend bei gramnegativen Keimen, z.B. bei *Pseudomonas*) (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1989), andere wiederum spalten auch Monobactame und Carbapeneme (SABATH *et al.*, 1965; NEWTON und HAMILTON-MILLER, 1967; THORNSBERRY und YEE, 1996; PITOUT *et al.*, 1997a; SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001). Grampositive Bakterien können  $\beta$ -Laktamasen nach außen ins umgebende Milieu

entlassen, gramnegative Bakterien in den periplasmatischen Raum zwischen Zellwand und Cytoplasmamembran. Bei grampositiven Bakterien unterscheidet man somit sensible (nicht produzierende) und resistente (produzierende) Bakterien, bei gramnegativen Bakterien sind graduelle Aktivitätsabstufungen möglich (STAHLMANN und LODE, 2001).

Die  $\beta$ -Laktamase-Produktion kann quantitativ veränderlich sein (PITOUT *et al.*, 1997a; STAHLMANN und LODE, 2001). Cephalosporine können Induktoren der Penicillinase darstellen, hierauf beruht die Resistenzbildung mancher Keime gegenüber Penicillinen bei Behandlung mit Cephalosporinen (CROMPTON *et al.*, 1962; ABRAHAM und NEWTON, 1965; KUSCHINSKY und LÜLLMANN 1989; LESSEL, 1996). Bei induzierbarer (chromosomal vermittelter)  $\beta$ -Laktamase-Produktion wird die Menge der gebildeten Abwehrenzyme unter dem Einfluss bestimmter  $\beta$ -Laktam-Antibiotika erhöht. Während einer Phase hoher induzierter  $\beta$ -Laktamase-Produktion können resistente Mutanten mit dauerhaft hoher, nunmehr konstitutiver  $\beta$ -Laktamase-Produktion hervorgehen. Daneben hat die übertragbare (Plasmid- oder Transposon-vermittelte)  $\beta$ -Laktamase-Produktion eine große Bedeutung. Durch Flexibilität im Austausch „beweglicher Gene“ entstehen qualitativ neuartige  $\beta$ -Laktamasen (PITOUT *et al.*, 1997a; STAHLMANN und LODE, 2001).

Humanmedizinischen Studien in den USA zufolge nimmt die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bei gramnegativen Bakterien zu (PITOUT *et al.*, 1997a). Besonders Keime, die respiratorische Infektionen hervorrufen, scheinen dort zunehmend Resistenzen zu entwickeln. So wurde in einer Studie in den Jahren 1994 - 1995 festgestellt, dass 3,4 % der klinisch signifikanten *Str. pneumoniae*-Isolate eine Cefotaxim (und Ceftriaxon bzw. Cefpodoxim) Resistenz besitzen (DOERN, 1995). Eine europäische Studie zu Resistenzmechanismen und *in vitro*-Aktivität verschiedener Antibiotika bei klinischen *Str. pneumoniae*-Isolaten aus den Jahren 1997 - 1999 zeigte, dass die *in vitro*-Aktivitäten der getesteten Cephalosporine je nach Höhe der Penicillin-Resistenz variierten. Es bestand ein Zusammenhang zwischen Cephalosporin-Resistenz und Penicillin-Resistenz (SCHMITZ *et al.*, 2001). PIDDOCK *et al.* (1997) fanden Resistenzen gegen einige  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (einschließlich Cefotaxim und Ceftazidim) in vielen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Andere amerikanische Studien des National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems (NARMS, nationales Überwachungsprogramm der antimikrobiellen Resistenzentwicklung, DESEO, 2000)

können keinen Anstieg von Antibiotikaresistenzen bei „foodborne pathogens“ wie *E. coli*, *Campylobacter* und *Salmonella* feststellen, jedoch wurden bei 6,7 % der *Salmonella* Typhimurium-Isolate eine Resistenz gegen Cefalothin und bei 4,2 % eine Resistenz gegen Cefotiofur gefunden.

Zunehmender Einsatz von Cephalosporinen in der Veterinärmedizin erhöht hier ebenfalls die Gefahr der bakteriellen Resistenzbildung und ist für viele Keime untersucht worden (NEU, 1992; BLANCO *et al.*, 1993; ESPINASSE, 1993; BÖTTNER *et al.*, 1995; TROLLDENIER, 1996; KLARMANN, 1997; PITOUT *et al.*, 1997b ; BRADFORD *et al.*, 1999; ORDEN *et al.*, 1999; TROLLDENIER, 1999; KRABISCH und GANGL, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; FEDESA, 2001; KOTARSKI *et al.*, 2001; ALLEN und POPPE, 2002; KOTARSKI *et al.*, 2002; DOCIC und BILKEI, 2003; GRAY *et al.*, 2004; HANAKI *et al.*, 2004; HARIHARAN *et al.*, 2004). Neueren Untersuchungen zufolge konnten allerdings ERSKINE *et al.* (2002a) während eines siebenjährigen Untersuchungszeitraumes zur antibakteriellen Empfindlichkeit von Mastitiserregern keine Anzeichen für eine ansteigende Resistenz dieser Isolate gegenüber Antiinfektiva, die bei Milchrindern häufig eingesetzt werden, feststellen.

#### 2.2.3.4 Pharmakokinetik

Das pharmakokinetische Verhalten der einzelnen Cephalosporine ist sehr unterschiedlich. Prinzipiell ist anzuführen, dass  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sich im Extrazellulärraum verteilen und intrazellulär lokalisierte Bakterien nicht erreicht werden. Die überwiegende Zahl der verwendeten Stoffe wird renal eliminiert, wobei sowohl glomeruläre Filtration als auch tubuläre Sekretion beteiligt sind (KROKER *et al.*, 1996; STAHLMANN und LODE, 2001).

##### 2.2.3.4.1 Resorption

Nur wenige Cephalosporine sind magensäurestabil und aus dem Gastrointestinaltrakt gut resorbierbar, beispielsweise Cefalexin wird stark resorbiert. Die fehlende orale Wirkung von Cephalosporin C und einer Reihe anderer Cephalosporine ist primär allerdings nicht auf die mangelnde Säurestabilität, sondern auf mangelnde Absorption zurückzuführen

(ADAM und CHRIST, 1987; GRÄFE, 1992; SAI *et al.*, 1996), so zum Beispiel bei dem Cephalosporin Cefotiofur (EMEA, 1999a). Bei einigen Substanzen wird die ungenügende Absorption durch Esterbildung im Sinne des Pro-Drug-Konzeptes überwunden. Die veresterten Derivate (Pro-Drugs) besitzen eine höhere Bioverfügbarkeit und werden nach der Resorption durch unspezifische Esterasen gespalten, so dass der aktive Wirkstoff in der Blutbahn freigesetzt werden kann (CRAUSTE-MANCIET *et al.*, 1997; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001).

In der Blutbahn werden Cephalosporine in sehr unterschiedlichem Maße an Plasmaproteine und andere Moleküle gebunden. Die Proteinbindung ist meist sehr labil und leicht reversibel (ADAM und CHRIST, 1987; GRÄFE, 1992; STAHLMANN und LODE, 2001).

#### 2.2.3.4.2 Verteilung

Bei intramuskulärer (i.m.) oder subcutaner (s.c.) Applikation erfolgt die Freisetzung von Cephalosporinen aus der Injektionsstelle sehr schnell, Bioverfügbarkeiten zwischen 80 - 100 % wurden ermittelt (KROKER *et al.*, 1996). Cephalosporine verteilen sich nur extrazellulär in fast alle Gewebe, Organe und Körperflüssigkeiten, sie penetrieren gut in Knochen, Gelenke, Synovia sowie Perikard- und Pleuraflüssigkeit. Im entzündeten Knochengewebe werden höhere Konzentrationen erreicht als im gesunden Knochen (ADAM und CHRIST, 1987; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; NAVARRE *et al.*, 1999; PRESCOTT *et al.*, 2000; THOMSON, 2003). Cephalosporine penetrieren jedoch schlecht in den *Liquor cerebrospinalis*, vor allem bei nicht (mehr) entzündlich veränderten Meningen (ADAM und CHRIST, 1987; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001). Der in bakteriellen Entzündungsherden meist leicht saure pH-Wert begünstigt die antibakterielle Aktivität der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001). Cephalosporine passieren die Plazentarschranke und erreichen im fetalen Serum höhere Konzentrationen als im mütterlichen Serum (ADAM und CHRIST, 1987; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995). In geringen Konzentrationen gelangen sie auch in die Milch (2.2.3.4.3).

#### 2.2.3.4.3 *Metabolisierung und Elimination*

Die parenteral anzuwendenden Cephalosporine werden zu unterschiedlichen Anteilen zu Deacetyl-Metaboliten biotransformiert, während die Oralcephalosporine (z.B. Cefalexin) relativ unverändert bleiben (KROKER *et al.*, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000). Die Elimination erfolgt zu Deacetyl-Abbauprodukten mit eigenen, zum Teil antimikrobiell aktiven, Metaboliten. Diese besitzen jedoch eine verringerte antimikrobielle Aktivität im Vergleich zur Muttersubstanz (CABANA *et al.*, 1976; MASON und KIETZMANN, 1999; MOATS *et al.*, 2000; PRESCOTT *et al.*, 2000).

In Studien bei Tieren (meist Ratten und Mäuse) werden mit Ausnahme von Ceftriaxon (Halbwertszeit etwa 8 h) die meisten Cephalosporine rasch (Halbwertszeiten von 1 - 2 h) eliminiert (SULLIVAN *et al.*, 1969; GRIFFITH und BLACK, 1970; NIGHTINGALE *et al.*, 1975; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001). Die überwiegende Zahl der verwendeten Cephalosporine (außer Cefoperazon und Ceftriaxon) wird renal eliminiert, und zwar sowohl durch glomeruläre Filtration als auch durch tubuläre Sekretion (HEWITT, 1973; NIGHTINGALE *et al.*, 1975; ADAM und CHRIST, 1987; KROKER *et al.*, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001). Die Unterschiede in der urinären Exkretion können substanzabhängig 15 – 91 % betragen (GRÄFE, 1992). Bei Niereninsuffizienz kann es bei einigen Substanzen zu einer erhöhten biliären Ausscheidung kommen (NAJIB *et al.*, 1987; BRANDER *et al.*, 1991; STAHLMANN und LODE, 2001).

Cefalexin wird nach oraler Gabe nahezu vollständig resorbiert und im gesamten Organismus verteilt, eine Passage der Blut-Hirn-Schranke erfolgt nicht. Die Plasmaeiweißbindung beträgt ca. 15 % (BRANDER *et al.*, 1991). Bei Rindern werden nach durchschnittlich 0,25 - 2,5 h (parenterale Gabe) bzw. 2,5 - 5,3 h (orale Gabe) maximale Serumkonzentrationen erreicht. Als Halbwertszeit werden durchschnittlich 0,5 - 2,0 h (bis maximal 4,6 h) (ARCHIMBAULT *et al.*, 1981) ermittelt. In Abhängigkeit von Formulierung und Dosierung wurden nach intramammärer Verabreichung Serumkonzentrationen von bis zu 0,4 µg/ml bis einen Tag nach der Behandlung ermittelt, im Eutergewebe konnte bis neun Tage nach der letzten Behandlung noch Cefalexin (69 µg/g) nachgewiesen werden. Cefalexin wird kaum metabolisiert, ca. 90 % werden über die Nieren ausgeschieden, 6 - 16 % über die Faeces (SULLIVAN *et al.*, 1969; GRIFFITH und BLACK, 1970; BAILLEY *et al.*, 1971; SPEIGHT *et al.*, 1972; NIGHTINGALE *et al.*,

1975; ARCHIMBAULT *et al.*, 1981; CARLI *et al.*, 1983; SOBACK *et al.*, 1987; SOBACK *et al.*, 1988; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; WHITTEM und SLACEK, 1996; KROKER, 1999; EMEA, 1999b; STAHLMANN und LODE, 2001). In bei Rindern durchgeführten Studien wurden die höchsten Organ-Rückstandsmengen in der Niere und der Leber gefunden. Die Ergebnisse pharmakokinetischer Studien sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 dargestellt.

Die MRL-Summarys der EU (EMEA, 1999a; EMEA, 2002a) bestätigen, dass im Gegensatz zu der geringen Absorption bei oraler oder intramammärer Verabreichung nach der intramuskulären Verabreichung Ceftiofur schnell absorbiert wird. Nach Gebrauchsinformation des Präparates Excenel<sup>®</sup> RTU (PHARMACIA UPJOHN GmbH, Stand 2000) wird Ceftiofur „schnell“ zu dem „in gleicher Weise“ wie Ceftiofur antimikrobiell wirksamen Hauptmetaboliten DFC metabolisiert. Dies erfolgt (in allen Tierspezies) durch Abspaltung von Furansäure zu DFC, welches weiter zu DFC-Disulfid (Dimer), DFC-Cystein, DFC-Cystein Disulfid, und DFC-Gluthation Disulfid umgebaut werden kann. DFC kann in freier Form oder in gebundener Form vorliegen. In Rinderplasma (und Milch) kommt als Hauptmetabolit DFC gebunden an Proteine vor (JAGLAN *et al.*, 1989; JAGLAN *et al.*, 1990; JAGLAN *et al.*, 1992; BECONI-BARKER *et al.*, 1996a; MOATS und BUCKLEY, 1996; MOATS und BUCKLEY, 1998; OLSON *et al.*, 1998; EMEA, 1999a; HORNISH und KOTARSKI 2002), ähnlich ist es auch bei Schafplasma (BECONI-BARKER *et al.*, 1995a).

Tabelle 2.1: Cefalexinspiegel im Plasma und Eutergewebe (Referenz: EMEA 1999b)

<b>Substanz</b>	<b>Applikationsart (Tierart)</b>	<b>Dosierung</b>	<b>gemessener Rückstand (gemessen in)</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>T<sub>max</sub></b>
Cefalexin	oral (Kälber)	25 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin (Plasma)	3,75 µg/ml	5,33 h
Cefalexin	intramuskulär (Kälber)	15 mg/kg KGW wiederholt (alle 12 h)	Cefalexin (Plasma)	7,94 - 11,6 µg/ml	1 - 2 h nach Injektion
Cefalexin- Natrium	intramuskulär (laktierende Rinder)	7 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin (Plasma)	11,8 µg/ml	0,5 h
Cefalexin- Monohydrat	intramammär (laktierende Rinder)	200 mg/Euterviertel einmalig	Cefalexin (Plasma)	0,252 - 0,387 µg/ml	3 - 12 h
Cefalexin- Monohydrat	intramammär (laktierende Rinder)	200 mg/Euterviertel wiederholt (4 aufeinander- folgende Melkungen)	Cefalexin (Eutergewebe)	790 µg/kg 69 µg/kg	12 h 9 Tage nach Behandlung

Legende:

KGW = Körpergewicht; h = Stunde(n); C<sub>max</sub> = gemessene Maximalkonzentration; T<sub>max</sub> = Zeitpunkt der gemessenen Maximalkonzentration

Tabelle 2.2: Übersicht über Literaturangaben zu Cefalexinspiegeln im Plasma nach parenteraler Applikation

Substanz	Applikationsart (Tierart)	Dosierung	gemessener Rückstand	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>½</sub>	Referenz
Cefalexin- Lysinat	intravenös (Kälber)	10 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	20 µg/ml	15 min	52 min	ARCHIMBAULT <i>et al.</i> (1981)
Cefalexin- Monohydrat	intramuskulär (Kälber)	10 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	5,2 µg/ml	30 - 60 min	4,6 h	
Cefalexin- Natrium	intramuskulär (Kälber)	30 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	15,6 µg/ml	15 min	89,8 ± 18,9 min	CARLI <i>et al.</i> (1983)
Cefalexin- Lysin	intramuskulär (Kälber)	30 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	24,0 µg/ml	26 min	55,2 ± 2,4 min	
Cefalexin- Monohydrat	oral (Kälber)	15 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	1,85 µg/ml	150 min	65 min	SOBACK <i>et al.</i> (1987)
Cefalexin- Glycinat	intramuskulär (laktierende Rinder)	10 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	k.A.	k.A.	46,4 ± 7,4 min	SOBACK <i>et al.</i> (1988)
Cefalexin- Glycinat	intravenös (laktierende Rinder)	10 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	k.A.	k.A.	35,1 ± 5,4 min	
Cefalexin	intramuskulär (laktierende Rinder)	7,5 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	9,89 mg/l	0,63 h	k.A.	WHITTEM und SLACEK (1996)
Cefalexin	intramuskulär (laktierende Rinder)	7,5 mg/kg KGW einmalig	Cefalexin	4,73 mg/l	1,65 h	k.A.	

Legende:

k.A. = keine Angabe; KGW = Körpergewicht; min = Minuten; h = Stunde(n); C<sub>max</sub> = gemessene Maximalkonzentration; T<sub>max</sub> = Zeitpunkt der gemessenen Maximalkonzentration; T<sub>½</sub> = Halbwertszeit

Bei Rindern betrug die Plasma-Halbwertszeit von (nur) Ceftiofur nach intravenöser (i.v.) Gabe weniger als 10 min (BANTING *et al.* 1989; BECONI-BARKER *et al.*, 1997; HORNISH und KOTARSKI; 2002). Im Serum konnte schon nach 1 - 4 h keine Muttersubstanz mehr detektiert werden (BROWN *et al.* 1991b; EMEA, 1999a; BROWN *et al.*, 2000). In Abhängigkeit von der Formulierung und Dosierung (Applikationsart, -menge und -häufigkeit) wurden bei Rindern maximale Plasmaspiegel an Ceftiofur und Metaboliten nach 0,3 - 5 h mit Eliminationshalbwertszeiten von 3 - 22 h erreicht (BANTING *et al.*, 1989; SOBACK *et al.*, 1989; JAGLAN *et al.*, 1990; BROWN *et al.*, 1991b; SOBACK *et al.*, 1991; HALSTEAD *et al.*, 1992; BROWN und ROBB, 1995; ERSKINE *et al.*, 1995; WEISKOPF und KAUSCHE, 1995; BROWN *et al.*, 1996; VERMEERSCH *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1997; ROBB *et al.*, 1997a; PHARMACIA & UPJOHN COMPANY, 1998; EMEA, 1999a; BROWN *et al.*, 2000; SCHMITT *et al.*, 2000; HORNISH und KOTARSKI, 2002; OKKER *et al.*, 2002, siehe auch Tabelle 2.3 im Anhang). Ein 7 h nach der Applikation bei gesunden Kühen im Vergleich zu an Mastitis erkrankten Kühen festgestellter höherer Serumspiegel lässt ERSKINE *et al.* (1995) auf eine raschere Clearance in infizierten Tieren schließen. Nach MRL-Summary der EU (EMEA, 1999a) bestanden 99 % der Rückstände im Plasma (0,5 - 8 h nach der Verabreichung) aus DFC und DFC-Thiolakton (ca. 1:4 w/w). In diesen bei Rindern durchgeführten Studien wurden die höchsten Organ-Rückstandsmengen in der Niere (> 70 %) gefunden, teilweise jedoch auch in der Leber, in der ein langsamerer Rückstandsabbau erfolgte (EMEA, 1999a).

Der Metabolit DFC konnte bereits 1 h nach i.m. Ceftiofur-Natrium Applikation im Rinderserum detektiert werden (JAGLAN *et al.*, 1989; JAGLAN *et al.*, 1990). Maximale Plasmakonzentrationen von DFC waren beim Rind nach 2 - 3 h und beim Schwein nach 1 h erreicht. Die Halbwertszeit des Hauptmetaboliten wurde beim Rind mit 10 - 11 h, und beim Schwein mit 13 - 19 h angegeben. Nach täglicher Behandlung über fünf Tage (Rind) bzw. drei Tage (Schwein) wurde keine Akkumulation beobachtet (SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; RITTER *et al.*, 1996; KLUGE, 1998; EMEA, 1999a; PHARMACIA UPJOHN GmbH, Gebrauchsinformation Excenel<sup>®</sup> RTU, Stand 2000).

Die Elimination von Ceftiofur erfolgt durchschnittlich zu mehr als 60 % (Ceftiofur-Hydrochlorid: Rind > 55 %, Schwein > 70 %) über die Nieren und zu ca. 30 % (Ceftiofur-Hydrochlorid: Rind 31 %, Schwein ca. 6 -16 %) über den Gastrointestinaltrakt und die

Faeces (JAGLAN *et al.*, 1989; GILBERTSON *et al.*, 1995b; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; BECONI-BARKER *et al.*, 1996b; RITTER *et al.*, 1996; KLUGE, 1998; EMEA, 1999a; PHARMACIA UPJOHN GmbH, Gebrauchsinformation, Stand 2000; HORNISH und KOTARSKI, 2002). Im Urin von Rindern fand sich dabei meist nur der Hauptmetabolit DFC, es waren keine Spuren (JAGLAN *et al.*, 1989) bzw. „geringe Mengen“ (EMEA, 1999a) der Muttersubstanz Cefotiofur nachgewiesen worden. Als Rückstände wurden weiterhin Metaboliten wie DFC-Cystein Disulfid und DFC-Cystein (Dimer) im Urin gefunden (JAGLAN *et al.*, 1990; BROWN *et al.*, 1991b; JAGLAN *et al.*, 1992; ROBB *et al.*, 1997b; MOATS und BUCKLEY, 1998; EMEA, 1999a), die sich jedoch als wenig stabil erwiesen (GILBERTSON, *et al.* 1990; KOTARSKI *et al.*, 2001; HORNISH und KOTARSKI, 2002 KOTARSKI *et al.*, 2002). Im Faeces scheinen analoge Zersetzungsmechanismen wie im Urin vorhanden zu sein, diese beschleunigten sogar die Zersetzung mikrobiologisch noch aktiver Cefotiofur-Metaboliten im Urin (GILBERTSON, *et al.*, 1990; KOTARSKI *et al.*, 2001; HORNISH und KOTARSKI, 2002).

Die pharmakokinetischen Studien zu Cefotiofur sind in Tabelle 2.3 (siehe Anhang) zusammengestellt. Es zeigte sich, dass sich unabhängig von der Applikationsart (s.c. oder i.m.) beide Salzformen des Cefotiofurs (Natriumsalz oder Hydrochlorid) pharmakokinetisch vergleichbar verhalten, zudem hatten sie eine ähnliche therapeutische Effektivität und systemische Sicherheit (ROBB *et al.*, 1997a; HORNISH und KOTARSKI, 2002).

Cephalosporine können in geringen Konzentrationen in die Milch gelangen (ZIV *et al.*, 1973; ADAM und CHRIST, 1987; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995). Nachfolgend wird auf die Ausscheidung der in dieser Arbeit verwendeten Cephalosporine näher eingegangen. Die Ergebnisse pharmakologischer Studien sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 aufgeführt.

Nach der Verabreichung von radioaktiv markierten Cefalexin fanden sich in Abhängigkeit von Formulierung und Dosierung (Applikationsart, -menge und -häufigkeit) nur geringe Anteile (weniger als 5 - 15 %) der Radioaktivität in Milchproben wieder (ARCHIMBAULT *et al.*, 1979; ARCHIMBAULT *et al.*, 1981; SOBACK *et al.*, 1988; MORETAIN und BOISSEAU, 1989; EMEA, 1999b; FABRE *et al.*, 2000).

Für die Ausscheidung von Ceftiofur in Milch ist neben der Dosierung auch der Applikationsweg entscheidend. Nach parenteraler Verabreichung an laktierende Milchkühe wird Ceftiofur rasch metabolisiert und nur ungefähr 0,1 - 0,15 % der applizierten Dosis mit der Milch ausgeschieden. Dabei können Individualwerte auch oberhalb des MRL liegen (JAGLAN *et al.*, 1992; KAUSCHE *et al.*, 1997; PHARMACIA & UPJOHN COMPANY, 1998; STANKER *et al.*, 1998). Bei an Mastitis erkrankten Kühen konnte Ceftiofur wesentlich länger nachgewiesen werden als bei nicht infizierten Kühen (ERSKINE *et al.*, 1995). Der Hauptrückstand in Milch nach parenteraler Gabe ist proteingebundenes DFC, die Muttersubstanz Ceftiofur konnte nicht detektiert werden. Dies bestätigt auch die MRL-Summary der EU (EMEA, 1999a), dort konnte bei *lege artis* (d.h. subcutaner) Anwendung bei Rindern kein nicht-metabolisiertes Ceftiofur in der Milch detektiert werden. Dagegen stellt sich nach intramammärer Applikation von Ceftiofur die Muttersubstanz Ceftiofur als Hauptrückstand dar. Wird sie in der Milch gefunden, lässt dies daher auf eine intramammäre Verabreichung schließen (OWENS *et al.*, 1990; SOBACK *et al.*, 1991; TYCZKOWSKA *et al.*, 1993; KAUSCHE *et al.*, 1997; EMEA, 1999a; HORNISH und KOTARSKI, 2002; EMEA, 2002a; BECKER, *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004; MAKESWARAN *et al.*, 2005).

Tabelle 2.4: Literaturdaten zur Ausscheidung von Cefalexin über die Milch laktierender Kühe

<b>Substanz</b>	<b>Applikationsart</b>	<b>Dosierung</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>T<sub>max</sub></b>	<b>Referenz</b>
Cefalexin-Monohydrat	intramammär	100 mg/Viertel dreimalig (alle 12 h)	< 0,001 µg/ml	8 Melkungen nach Behandlungsende	ARCHIMBAULT et al. (1979)
Cefalexin-Lysinat	intravenös	10 mg/kg KGW einmalig	k.A.	k.A.	ARCHIMBAULT et al. (1981)
Cefalexin-Glycinat	intramuskulär intravenös	10 mg/kg KGW einmalig 10 mg/kg KGW einmalig	< 0,1 µg/ml < 0,1 µg/ml	k.A. k.A.	SOBACK et al. (1988)
Cefalexin-Monohydrat	intramammär	100 mg/Viertel dreimalig	8,5 µg/ml	1. Gemelk nach Behandlungsende	MORETAIN und BOISSEAU (1989)
Cefalexin-Natrium C <sup>14</sup>	intramuskulär	7 mg/kg KGW einmalig	k.A.	k.A.	EMEA (1999b)
Cefalexin	intramammär	k.A.	k.A.	k.A.	FABRE et al. (2000)

Legende:

k.A. = keine Angabe; KGW = Körpergewicht; h = Stunde(n); C<sub>max</sub> = gemessene Maximalkonzentration; T<sub>max</sub> = Zeitpunkt der gemessenen Maximalkonzentration

Tabelle 2.5: Literaturdaten zur Ausscheidung von Ceftiofur und/oder Metaboliten über die Milch laktierender Kühe

<b>Substanz</b>	<b>Applikationsart</b>	<b>Dosierung</b>	<b>gemessener Rückstand</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>T<sub>max</sub></b>	<b>Referenz</b>
Ceftiofur-Na	intramuskulär	500 mg/Tier zweimalig (alle 24 h)	Ceftiofur	< NWG	k.A.	1
Ceftiofur-HCl	intramammär	100 mg/Tier einmalig	Ceftiofur	280 µg/ml	4 h	
Ceftiofur-HCl	intramammär	200 mg/Tier zweimalig (alle 24 h)	Ceftiofur	450 µg/ml	4 - 6 h nach der 1. Infusion	
Ceftiofur-Na	intramuskulär	500 mg/Tier einmalig	Ceftiofur	220 µg/ml	2 h nach der 2. Infusion	
und				100 µg/ml	4 h	
Ceftiofur-HCl	intramammär	100 mg/Tier Kombination in				
Ceftiofur-Na	intravenös	2 mg/kg KGW einmalig	Ceftiofur	> 10 ng/ml	k.A.	2
Ceftiofur-Na	intravenös	16 mg/kg KGW einmalig	Ceftiofur	< 100 ng/ml	k.A.	
Ceftiofur-Na	intramuskulär	2,29 mg/kg KGW fünfmalig (1xd)	Ceftiofur+Metaboliten	0,1 µg/ml	jeweils 12 h nach der 2., 3., 4. und 5. Injektion	3
Ceftiofur-Na	intramuskulär	1,1 mg/kg KGW einmalig	Ceftiofur+Metaboliten	0,1 µg/ml	12 h	
Ceftiofur-Na	intravenös	3,0 mg/kg KGW dreimalig (alle 24 h)	Ceftiofur	0,28 µg/ml	k.A.	4
Ceftiofur-Na	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig	Ceftiofurgesamt-rückstände	k.A.	10 - 12 h	5
Ceftiofur-HCl	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW fünfmalig (alle 24 h)	Ceftiofurgesamt-rückstände	85,0 µg/ml	5 d 12 h	6
Ceftiofur *	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW fünfmalig (1xd)	DFC-Äquivalente	115 µg/kg	12 h nach der letzten Dosis	7
Ceftiofur *	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW fünfmalig (1xd)	DFC-Äquivalente	71 µg/kg	10 h nach der letzten Dosis	

Fortsetzung Tabelle 2.5:

Substanz	Applikationsart	Dosierung	gemessener Rückstand	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	Referenz
C 14-Ceftiofur	intramammär	125 mg/Viertel zweimalig (alle 12 h)	Ceftiofur+Metaboliten gemessen als DFA	44200 µg/l	nach der 2.Dosis innerhalb von 72 h	8
C 14-Ceftiofur	intramammär	125 mg/Viertel zweimalig (alle 24 h)	Ceftiofur+Metaboliten gemessen als DFA	49660 µg/l	12 h nach der 2.Dosis innerhalb von 132 h	
Ceftiofur-HCl	intramammär	600 mg/Tier zweimalig (alle 12 h)	Ceftiofur+Metaboliten gemessen als DFA	214,7 µg/ml als C <sub>av</sub>	12 h nach der letzten Dosis	9

Legende:

\* = keine Angabe, ob es sich u Ceftiofur-Natrium (Na) oder Ceftiofur-Hydrochlorid (HCl) handelt;

DFC = Desfuroylceftiofur; DFA = Desfuroylceftiofur-Acetamid;

k.A. = keine Angabe; KGW = Körpergewicht; NWG = Nachweisgrenze; 1xd = einmal täglich; h = Stunde(n);

C<sub>av</sub> = average Ceftiofur, durchschnittliche Ceftiofurmenge; C<sub>max</sub> = gemessene Maximalkonzentration; T<sub>max</sub> = Zeitpunkt der gemessenen Maximalkonzentration

Referenz:

- 1) OWENS *et al.* (1990)
- 2) SOBACK *et al.* (1991)
- 3) JAGLAN *et al.* (1992)
- 4) ERSKINE *et al.* (1995)
- 5) KAUSCHE *et al.* (1997)
- 6) PHARMACIA & UPJOHN COMPANY (1998)
- 7) EMEA (1999a)
- 8) EMEA (2002a)
- 9) SMITH *et al.* (2004)

### 2.2.3.5 Toxizität und Nebenwirkungen

#### 2.2.3.5.1 Toxizität

Cephalosporine weisen prinzipiell eine geringe Toxizität auf (GRÄFE, 1992; DEMAIN und ELANDER, 1999; KROKER, 1999; PRESCOTT *et al.*, 2000). So besitzt beispielsweise Ceftiofur eine geringe akute orale und parenterale Toxizität (EMEA, 1999a) und wird von Kälbern bei 20 bzw. 50facher Überdosierung über 15 bzw. fünf Tage gut vertragen, bei Schweinen wird eine achtfache Überdosierung noch gut vertragen (SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995). Längerfristige Ceftiofur-Exposition führt bei *in vitro* Experimenten zur Cytostase mit Auftreten von Chromosomenabberationen, dieser Effekt ist jedoch reversibel und scheint sich *in vivo* nicht bestätigen zu lassen (AARON *et al.*, 1995a+b+c). Die Häufigkeit von Nebenwirkungen ist beim klinischen Einsatz von Cefalexin ebenfalls gering (BAILEY *et al.*, 1971).

Allerdings haben Cephalosporine ein höheres nephrotoxisches Potential als Penicilline, was auf die Bildung von Immunkomplexen in der glomerulären Basalmembran oder auf die Kumulation von Eosinophilen in Interstitium zurückzuführen ist (QUIN, 1989; KROKER *et al.*, 1996). Besonders Cephalosporine der 1. Generation wie Cefaloridin führen dosisabhängig durch Kumulation im Cortex zu tubulären Nekrosen (HEWITT, 1973; QUIN, 1989; HALLIGAN *et al.*, 1995; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; KROKER *et al.*, 1996; TUNE *et al.*, 1996; LONGSTRETH *et al.*, 2004). Als Mechanismen dafür werden eine vermehrte sekretorische Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen sowie das Reaktionsvermögen des  $\beta$ -Laktamringes in Betracht gezogen (TUNE und HSU, 1995).

Bei der Anwendung von Cephalosporinen können nach hohen Dosen oder Langzeitanwendung immunologisch bedingte Störungen wie Neutropenie, Agranulozytose, Thrombozytopenie, Hepatitis und interstitielle Nephritis auftreten (GRALNICK und MCGINNIS, 1967; RUSSELL und LESSOF, 1971; HEWITT, 1973; PETZ, 1978; KNOTHE und DETTE, 1982; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; KELKAR und LI, 2001; STAHLMANN und LODE, 2001; SKOOG *et al.*, 2004). Neurotoxische Symptome (Erregungszustände, Konvulsionen) werden selten beobachtet. Sie treten lediglich bei extrem hohen Dosierungen sowie Kumulation durch stark verlängerte Ausscheidung und bei Schädigung der Bluthirnschranke (z.B. bei Meningitiden) auf (KROKER, 1999). Gelegentliche Störungen des peripheren

Nervensystems sind nach Behandlung mit Cephalosporinen bei Patienten mit Niereninsuffizienz beobachtet worden (STAHLMANN und LODE, 2001).

#### 2.2.3.5.2 *Allergische Reaktionen*

Als wichtigste Nebenwirkung der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist das Auftreten von allergischen Reaktionen zu nennen.  $\beta$ -Laktame bzw. Cephalosporine sind zwar Haptene, jedoch kann der  $\beta$ -Laktamring über kovalente Proteinbindungen Allergisierungen fördern (SMITH *et al.*, 1966; RUSSELL und LESSOF, 1971; TUFT, 1975; BECKER, 1976; KNOTHE und DETTE, 1982; GARCÍA-BRAVO *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 1998; BALDO, 1999; KROKER, 1999; MASON und KIETZMANN, 1999; BLANCA *et al.*, 2002; ANTICO und MARCOTULLI, 2003; BLANCA GOMEZ *et al.*, 2004).

Grundsätzlich ist die Möglichkeit von Kreuzallergien zwischen Penicillinen und Cephalosporinen gegeben, dabei scheint die chemische Struktur der Seitenketten einen erheblichen Einfluss aufzuweisen. Untersuchungen hierzu stellen ein wichtiges Gebiet v.a. im Bereich der humanmedizinischen Allergieforschung dar (SCHNEIERSON *et al.*, 1964; BRANDRISS *et al.*, 1965; BATCHELOR *et al.*, 1966; GRIECO, 1967; PETERSEN und GRAHAM, 1974; PETZ, 1978; DELAFUENTE *et al.*, 1979; SHIHO und TSUCHIYA, 1981a+b; SHIHO *et al.*, 1981; IWATA *et al.*, 1982; SAXON *et al.*, 1987; BLANCA *et al.*, 1989; MACNAB, 1989; UNO und YAMASAKU, 1989; ADKINSON, 1990; NAGAKURA *et al.*, 1990; NAGAKURA *et al.*, 1991; AUDICANA *et al.*, 1994; BALDO und PHAM, 1994; KISHIYAMA und ADELMAN, 1994; BARTLETT *et al.*, 1996; MIRANDA *et al.*, 1996; PHAM und BALDO, 1996; ROMANO *et al.*, 1997; BALDO, 2000; BALDO *et al.*, 2001a+b; KELKAR und LI, 2001; NOVALBOS *et al.*, 2001; BALDO und PHAM, 2002; BAUMGART und BALDO, 2002; ZHAO *et al.*, 2002; BLANCA und TORRES, 2003; BLANCA GOMEZ *et al.*, 2004).

Allergische Reaktionen nach einer Behandlung mit Cephalosporinen kommen jedoch selten vor, da die metabolisch entstehenden stark allergenen Penicilloyl-Verbindungen nicht auftreten (AUDICANA *et al.*, 1994; EMEA, 1999a; ROMANO *et al.*, 2000a+b).

Unter Einbeziehung humanmedizinischer Studien werden in der Literatur in ca. 1 - 3 % der Fälle ein Auftreten primär gegen Cephalosporine gerichteter allergischer Reaktionen beschrieben (PETZ, 1971; SAXON *et al.* 1987) und in etwa 5 - 16,5 % der Fälle kann es

bei Penicillinallergie zu Kreuzreaktionen mit Cephalosporinen kommen (PETZ, 1971; ADAM und CHRIST, 1987; SAXON *et al.*, 1987; WICKERN *et al.*, 1994; PRESCOTT *et al.*, 2000; KELKAR und LI, 2001; ROMANO *et al.*, 2004).

Die Häufigkeit allergischer Reaktionen auf Cephalosporine ist bei Tieren geringer als bei Menschen (MASON und KIETZMANN, 1999). Das Spektrum der individuellen Reaktionen reicht von Fieber, Exanthenen, Urticaria, Vaskulitis, hämolytischen Anämien, Eosinophilie, Lymphadenopathie, Serumkrankheit bis zu anaphylaktischen Reaktionen (GRIFFITH und BLACK, 1970; HEWITT, 1973; KNOTHE und DETTE, 1982; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; KROKER, 1999; PHARMACIA UPJOHN GmbH Gebrauchsinformation Stand 2000; ROMANO *et al.*, 2000a; KELKAR und LI, 2001; STAHLMANN und LODE, 2001).

#### 2.2.3.5.3 *Sonstige Nebenwirkungen*

Generell sind Cephalosporine zu den gut verträglichen Antibiotika zu rechnen. Sterile Abzesse oder Gewebnekrosen an der Injektionsstelle sind möglich, aber selten. Nach i.v. Applikation kann eine Thrombophlebitis auftreten. Oral verabreichte Cephalosporine können zu Nausea, Erbrechen, Anorexie und Diarrhoe führen (SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; NEU, 1996; PRESCOTT *et al.*, 2000).

Als seltene Nebenwirkungen sind insbesondere bei Patienten mit Risikofaktoren (z.B. Anomalien des Gerinnungssystems, Niereninsuffizienz) Hämostasestörungen mit Blutungsneigung (PRESCOTT *et al.*, 2000; STAHLMANN und LODE, 2001), verlängerte Clearance (NIGHTINGALE *et al.*, 1975; SPYKER *et al.*, 1978; NAJIB *et al.*, 1987), Störungen der physiologischen Darmflora (STAHLMANN und LODE, 2001), Hyperkaliämien oder -natriämien nach Gabe der Präparate als entsprechende Salze (KNOTHE und DETTE, 1982; KROKER, 1999; STAHLMANN und LODE, 2001; LONGSTRETH *et al.*, 2004) sowie das Auftreten von neurotoxischen Symptomen (2.2.3.5.1) beschrieben worden.

Cephalosporine können das Migrationsverhalten von Leukozyten beeinflussen (DE SIMONE *et al.*, 1980), beispielsweise Ceftiofur scheint einen Einfluss auf die bakteriozide Aktivität polymorphkerniger Leukozyten in der Milch von Rindern zu haben (HOEBEN, 1997). Auch die Hemmung humaner und viraler Serin-Proteasen

(HAMILTON-MILLER, 1999) sowie die Beeinflussung enzymatischer Serum-Kreatinin-Bestimmungsreaktionen (durch Cefazolin, Cefoxitin bzw. Ceftiofur) wird beschrieben (JACOBS *et al.*, 1991).

Nach oraler Verabreichung von Cefalexin sind Wachstumshemmung, Appetitlosigkeit, Salivation, Erbrechen und Durchfall beobachtet worden (GRIFFITH und BLACK, 1970). Als häufigste Nebenwirkung tritt bei der i.m. Verabreichung von Cefalexin eine lokale Irritation an der Einstichstelle auf. In Studien mit Labortieren (Ratten und Mäuse) sind bei wiederholten Gaben oder hohen Dosierungen zudem Polyurie, Dehydration, Ptosis, Anorexie, Salivation, Veränderung der Blut-Biochemie und vermehrte Wasseraufnahme beobachtet worden (EMEA, 1999b).

Nach MRL-Summary der EU sind (bei Meerschweinchen) zum Teil anaphylaktische Hautreaktionen nach dem Kontakt mit DFC beobachtet worden. Bei einer Kuh traten Haarverlust und Pruritis (Juckreiz) nach der Verabreichung von Ceftiofur auf (TYLER *et al.*, 1998). In bei verschiedenen Tierarten durchgeführten Untersuchungen zur wiederholten (bis zu 90 Tage) Gabe von Ceftiofur sind neben gastrointestinalen Effekten und Störungen des hämatopoetischen Systems zudem eine Verringerung der Zahl der roten Blutkörperchen, reduzierte Serum-Glukosespiegel und Elektrolytimbalancen beobachtet worden (EMEA, 1999a). Längerfristige Behandlung in höheren Dosen kann sich jedoch schädlich auf die bovine Embryoentwicklung auswirken (HOLYOAK *et al.*, 1998).

#### 2.2.3.5.4 Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten

Bei Kombination mit Stoffen, die eine schnelle bakteriostatische Wirkung entfalten (Tetracycline, Chloramphenicol, Makrolide, Lincomycin), treten Wechselwirkungen in Form einer Wirkungsabschwächung auf (durch Wachstumshemmung), während Aminoglykoside synergistisch wirken, durch die erhöhte Membranpenetration der Aminoglykoside (KROKER *et al.*, 1996; KROKER, 1999; PRESCOTT *et al.*, 2000). Allerdings sollte eine Kombination mit den nephrotoxischen Aminoglykosiden oder Diuretika wie Furosemid wegen der schon vorhandenen Nephrotoxizität der (älteren) Cephalosporine (2.2.3.5.1) nur bei vitaler Indikation eingesetzt werden (KNOTHE und DETTE, 1982; RANKIN und SUTHERLAND, 1989; SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, 1995; STAHLMANN und LODE, 2001). Bei Gabe von

Thrombozytenaggregationshemmer erhöht sich durch Cephalosporine die Blutungsgefahr (MEDICINE-WORLDWIDE, 2002).

#### **2.2.4 Cephalosporine in der Veterinärmedizin**

Cephalosporine werden in der Veterinärmedizin zunehmend im Großtierbereich zur Behandlung von Klauenerkrankungen, Atemwegserkrankungen, Metritis und für die Mastitisbehandlung von Kühen eingesetzt (KLUGE, 1998; PRESCOTT *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2001; HORNISH und KOTARSKI, 2002; ZWALD *et al.*, 2004). In der Praxis wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Cefalexin (Abbildung 2.5), welches die Molekül-Grundstruktur der Cephalosporine am ehesten repräsentiert, und Ceftiofur (Abbildung 2.5), das aufgrund kurzer Wartezeit bzw. null Tagen Wartezeit häufig bei laktierenden Rindern zur Anwendung kommt.

Cefalexin-Natrium ist zur i.m. Behandlung von Infektionen durch Cefalexin-sensitive Erreger bei Rindern, Schafen und Schweinen zugelassen. Cefalexin wird als Cefalexin-Monohydrat sowohl zur intramammären Behandlung von Mastitis bei laktierenden Rindern und zur i.m. Behandlung von Infektionen bei Kälbern eingesetzt sowie auch als Cefalexin-Benzathin zur intramammären Behandlung und Vorbeugung von Infektionen bei trockenstehenden Kühen genutzt (EMEA, 1999b; VIRBAC GmbH, Produktinformation 2003).

Ceftiofurhaltige Präparate sind beim Rind zur Anwendung bei Atemwegserkrankungen, Panaritium und neuerdings auch bei akuter Metritis zugelassen (PHARMACIA UPJOHN GmbH, Produktinformation, 2003). Bezüglich der antimikrobiellen Aktivität von Ceftiofur bzw. Ceftiofur-Metaboliten werden unterschiedliche Aussagen publiziert. Nach MRL-Summary der EU (EMEA, 1999a) ist Ceftiofur die Substanz mit der größten mikrobiologischen Aktivität, die Ceftiofur-Metaboliten sind 16 - 32fach weniger mikrobiell aktiv. Nach Gebrauchsinformation des Präparates Excenel<sup>®</sup> RTU (PHARMACIA UPJOHN GmbH, Stand 2000) ist der Hauptmetabolit DFC „in gleicher Weise“ wie die Muttersubstanz Ceftiofur antimikrobiell wirksam gegen Erreger der Atemwegserkrankungen bei Tieren. Unter dem Markennamen Excenel<sup>®</sup> ist Ceftiofur-Natriumsalz zur i.m. Injektion bei Rindern und Schweinen zugelassen und besteht aus Lösungsmittel und Trockensubstanz, welche zur Verabreichung rekonstituiert wird. Bei

Excenel<sup>®</sup> RTU (Ceftiofur-Hydrochlorid) handelt es sich um eine gebrauchsfertige („ready to use“) Suspension, die in Deutschland bei Rindern zur s.c. und bei Schweinen zur i.m. Injektion zugelassen ist. Bei fachgerechter Anwendung (s.c. Applikation) des Präparates bei Rindern kommt als Rückstandsbildner nach MRL-Summary der EU (EMEA, 1999a) überwiegend der Metabolit DFC (Abbildung 2.4) in der Milch vor, während bei fehlerhafter Applikation mit Rückständen sowohl der Muttersubstanz als auch der Metaboliten gerechnet werden muss (ZOMER *et al.*, 1995; GILLETTE, 2001; SMITH *et al.*, 2004).

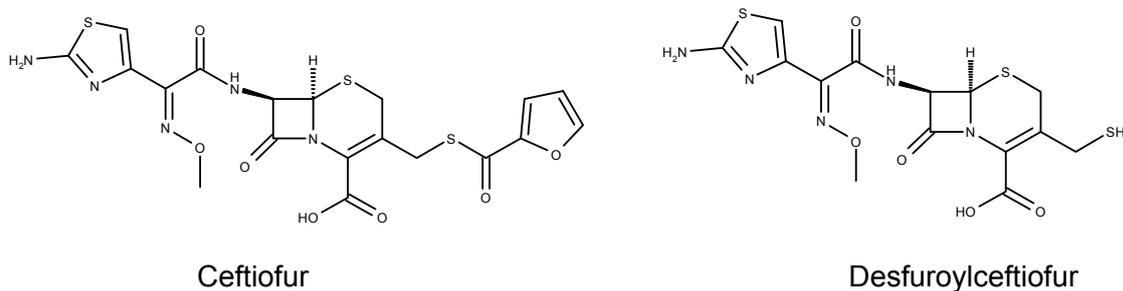
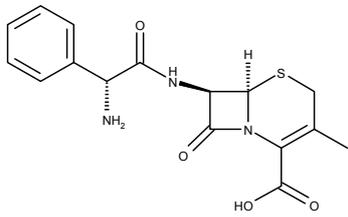


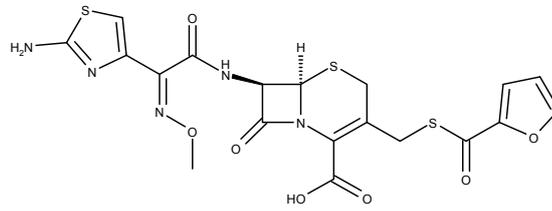
Abbildung 2.4: Strukturformel von Ceftiofur und des Hauptmetaboliten DFC

Die Grundlage für die Festsetzung einer Rückstandshöchstmenge eines für die Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Stoffes in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs bildet die „annehmbare Tagesdosis“ (ADI = acceptable daily intake), eine auf das Körpergewicht bezogene Abschätzung. Sie besteht aus dem sogenannten NOEL (no observed effect level; höchste Wirkstoffkonzentration, die keine substanzspezifischen Wirkungen mehr auslöst) und einem Sicherheitsfaktor, so dass die genannte Menge eines Rückstandes täglich und lebenslang verzehrt werden kann, ohne dass ein erkennbares gesundheitliches Risiko besteht (IDF, 1993; PETZ, 1993; BETTE, 1996; TOLLEFSON und MILLER, 2000).

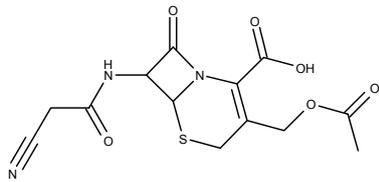
Die Rückstandshöchstmenge für Ceftiofur (Muttersubstanz plus Metaboliten) in Milch liegt bei 100 µg/kg, die Rückstandshöchstmenge für Cefalexin in Milch liegt ebenfalls bei 100 µg/kg (Verordnung (EWG) Nr. 2377/90; siehe 2.3.3).



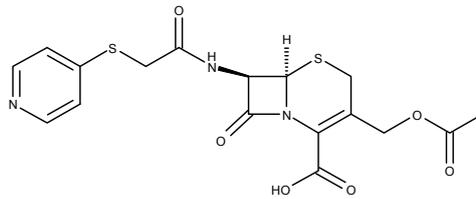
Cefalexin (100)



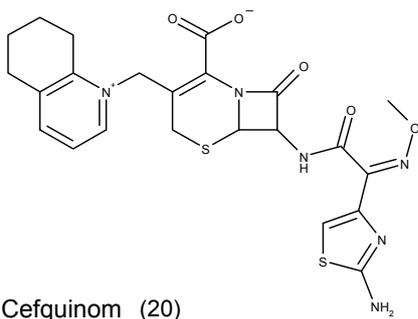
Cefotiofur (100)



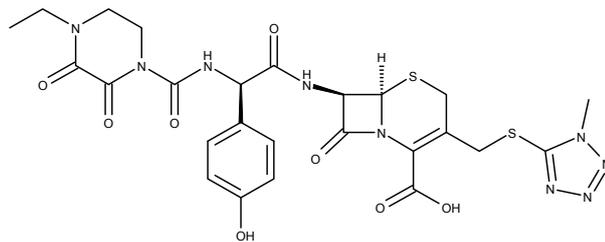
Cefacetril (125)



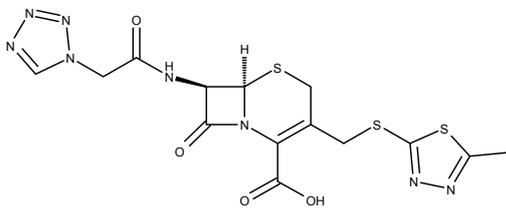
Cefapirin (60)



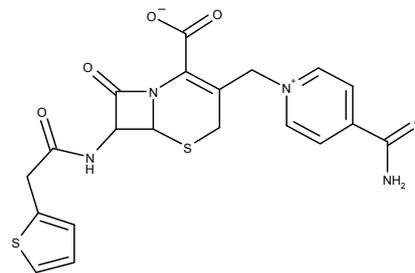
Cefquinom (20)



Cefoperazon (50)



Cefazolin (50)



Cefalonium (20)

Abbildung 2.5: Strukturformeln der mit MRL belegten Cephalosporine in Milch (Angabe des MRL in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Milch)

## **2.3 Cephalosporin-Rückstände in Milch**

### **2.3.1 Hemmstoffe in der Milch**

In der Lebensmittelhygiene werden Substanzen, die bakterielles Wachstum, z.B. von mikrobiologischen Testkeimen und Starterkulturen hemmen können, traditionell als „Hemmstoffe“ bezeichnet. Hemmstoffe sind Substanzen, die auf Mikroorganismen bakteriostatisch oder bakteriozid wirken (TERPLAN und ZAADHOF, 1967). Bei den in der Milch vorkommenden Hemmstoffen kann es sich um mit der Milch ausgeschiedene körpereigene Abwehrstoffe, Arzneimittelrückstände, Futterinhaltsstoffe, Insektizide oder um durch postsekretorische Kontamination verursachte Reste von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln handeln (CHAMBERS, 1920; JONES und LITTLE, 1927; MARTH, 1966; TERPLAN und ZAADHOF, 1967; GEDEK, 1984; IDF, 1991b; JÜLICHER, 1992; CULLOR, 1993; KINDRED und HUBBERT, 1993; RUSSELL, 1997). Die mit Abstand größte Bedeutung unter den in der Milch vorkommenden Hemmstoffen besitzen heute Rückstände von Arzneimitteln, insbesondere Antibiotikarückstände und hier wiederum die Penicilline (WICHER *et al.*, 1969; WICHER und REISMAN, 1980; MCINTOSH, 1986; SCHÄLLIBAUM, 1986a; ZOMER *et al.*, 1995; SUHREN *et al.*, 1996a; MITCHELL *et al.*, 1998; SUHREN und REICHMUTH, 1998b; SUHREN, 2002b; KERP *et al.*, 2004). Auch den Cephalosporinen kommt in den letzten Jahren vermehrt Bedeutung zu (GILLETTE, 2001; ZWALD *et al.*, 2004).

In Schleswig-Holstein zeigt die Untersuchung von Proben von der Tankwagen-sammelebene (BAFM, Jahresbericht 2001), dass von 4892 im Berichtszeitraum untersuchten Proben 15 positiv waren, das entspricht 0,31 % der getesteten Proben. In Hessen sind ähnliche Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchung aus der Tätigkeit des Hessischen Verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. (HVL) bekannt. Insgesamt waren in Hessen 0,12 % der auf Hemmstoffe untersuchten Proben im Prüfungsjahr 2001/2002 positiv, im Prüfungsjahr 2002/2003 waren es 0,11 % und im Prüfungsjahr 2003/2004 waren es 0,08 % (HVL, Jahresberichte 2002, 2003, 2004). Von den im Einzugsgebiet des HVL Hessens anfallenden hemmstoffpositiven Befunden wurden einige jeweils auf Wunsch des Milcherzeugers zur weiteren Untersuchung an unser Institut übersandt (HVL, 2003). Im Zeitraum von Januar 2003 bis Juli 2004 wurden so insgesamt 37 Anlieferungsmilchproben mit einem integrierten Nachweis- und Differenzierungssystem untersucht, dabei zeigte sich, dass in 95 % der Fälle der hemmstoffpositiven Proben, entweder Penicilline (86,5 %) oder Cephalosporine (8,1 %)

als Rückstands-verursachende Substanzen nachgewiesen werden konnten (KERP *et al.*, 2004). In Bayern bestätigten die Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchung aus der Tätigkeit des Milchprüfrings Bayern e.V. (MPR 2002, 2003; Tätigkeitsberichte 2001 und 2002), dass Penicilline nach wie vor den größten Anteil hemmstoffpositiver Anlieferungsmilch ausmachen. Von 1650 im Jahr 2001 positiv getesteten Milchproben – das entspricht 0,06 % der untersuchten Proben – waren 92,1 % auf Penicilline zurückzuführen. Von 1343 im Jahr 2002 positiv getesteten Milchproben – das entspricht 0,05 % der untersuchten Proben – waren 93,0 % auf Penicilline zurückzuführen.

Einschränkend ist bei diesen Angaben jedoch zu berücksichtigen, dass durch das Empfindlichkeitsspektrum der gebräuchlichen Hemmstofftests bereits eine Vorselektion auf  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nicht auszuschließen ist.

### **2.3.2 Ursachen von Cephalosporin-Rückständen in Milch**

Zur Bekämpfung von Mastitis, die in Ländern mit intensiver Milchwirtschaft eine der bedeutendsten und verlustreichsten Milchviehkrankheiten darstellt, werden sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch Antibiotika eingesetzt (MARTH, 1966; TERPLAN und ZAADHOF, 1975; GEDEK, 1986; SCHÄLLIBAUM, 1986a). In den letzten Jahren gewinnen Cephalosporine zunehmend an Bedeutung (HAMANN und HEESCHEN, 1995; ZWALD *et al.*, 2004). Mit dem erhöhten Antibiotika-Einsatz steigt auch das Risiko der Rückstandsbelastung von Milch. Als Hauptquelle hierfür ist dabei die intrazisternale/intramammäre Applikation von Antibiotika zur Mastitisbekämpfung zu betrachten. Aber auch die s.c., i.m., i.v. und intrauterine Anwendung antimikrobiell wirksamer Medikamente kann zu Rückständen in der Milch führen (WRIGHT und HAROLD, 1960; TERPLAN und ZAADHOF, 1967; GEDEK *et al.*, 1975a+b; TERPLAN und ZAADHOF, 1975; TROLLDENIER und ESCHER, 1978; ALLISON, 1985; OLIVER *et al.*, 1990; HAMANN und HEESCHEN, 1995; MORETAIN und FROGER, 1995; NAHMS, 1997).

Die Kontaminationsmöglichkeiten der Milch mit Antibiotika sind vielfältig. Grundsätzlich können Antibiotika durch sekretorische oder postsekretorische Kontamination in die Milch gelangen. Untersuchungen in der Schweiz in den Jahren 1986 bis 1989 ergaben, dass die Mehrzahl der positiven Hemmstoffergebnisse (59 %) ursächlich auf postsekretorische

Kontamination zurückzuführen ist (SCHÄLLIBAUM, 1986a, SCHÄLLIBAUM, 1989). Ähnliche Verhältnisse wurden in Bayern im Jahr 1999 festgestellt (MPR 2000; Tätigkeitsbericht 1999), in den Jahren 2000 - 2002 ist diese Entwicklung leicht rückläufig, wobei jedoch der Anteil der Fälle mit ungeklärter Kontaminationsursache ansteigt (MPR 2001, 2002, 2003; Tätigkeitsberichte 2000, 2001 und 2002).

Sekretorische Kontaminationen entstehen, wenn Hemmstoffe über den Stoffwechsel des Tieres in die Milch gelangen. Dabei kann es sich um mit der Milch ausgeschiedene körpereigene Abwehrstoffe (z.B. Lysozym, Lactoferrin), Futterinhaltsstoffe oder Insektizide handeln. Häufiger sind jedoch Nichteinhalten der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeit (zwischen Verabreichung des Medikaments und Gewinnung des Lebensmittels) sowie eine nicht fachgerechte Verabreichung des Medikaments (tierärztliche Behandlungsfehler, Einsatz ungeeigneter Medikamente oder zu hohe Dosis) die Ursachen. Zudem ist das Ausscheidungsverhalten einzelner Präparate von diesem selbst (galenische Zusammensetzung, Dosierung, Applikationsart, o.ä.) und vom behandelten Tier (Rasse, Alter, Geschlecht, Fütterung, Milchleistung, o.ä.) abhängig. Die heute in der Tiermedizin eingesetzten Präparate (2.2.4) sind im Allgemeinen mit einer Wartezeit belegt (Ausnahme: Ceftiofur = Excenel<sup>®</sup> RTU), die eine Sicherheitsspanne beinhaltet. Jedoch spielen das Nichteinhalten der Wartezeit oder der vorgeschriebenen Applikationsart (insbesondere bei dem Präparat ohne Wartezeit) zunehmend eine Rolle bei hemmstoffpositiven Cephalosporin-Befunden.

Postsekretorische Kontaminationen entstehen häufig durch Verwechslung der Milch behandelter und unbehaltener Kühe, Nichtbeachten der Melkreihenfolge, Verschleppung von Antibiotika sowie durch hygienische oder technische Mängel beim Melken. Seltener gelangen Reinigungs- und Desinfektionsmittelreste in die Milch (CHAMBERS, 1920; JONES und LITTLE, 1927; MARTH, 1966; TERPLAN und ZAADHOF, 1967; TROLLENIER und ESCHER, 1978; WALSER, 1979; BOOTH und HARDING, 1986; GEGEK, 1986; SCHÄLLIBAUM, 1986a; CARLSSON und BJÖRCK, 1987; SUHREN und HEESCHEN, 1987a; SCHÄLLIBAUM, 1989; IDF, 1991b; MCEWEN *et al.*, 1991; JÜLICHER, 1992; KIRST, 1992; MCEWEN *et al.*, 1992; RIVIERE, 1992; IDF, 1993; CULLOR *et al.*, 1994; FINK-GREMMELS und VAN MIERT, 1994; BRENTRUP und ALBERS, 1995; DEBACKERE, 1995; FABRE *et al.*, 1995; MORETAIN und FROGER, 1995; MITCHELL *et al.*, 1998; BAFM, 2001; GILLETTE, 2001; BAUMGARTNER, 2002; KNAPPSTEIN *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004).

### 2.3.3 Gesetzliche Bestimmungen und Richtlinien

Die Grundlage der lebensmittelrechtlichen Beurteilung von Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln liegt in § 10 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, LFGB) in Verbindung mit der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung (PharmStoffV). Nach § 10 Absatz 1 LFGB ist es verboten, vom Tier gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die bei den zur Nahrungsmittelerzeugung genutzten Tieren nicht angewendet werden dürfen oder Höchstmengen überschreiten. Verwiesen wird hierbei auf die Bestimmungen der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 vom 26. Juni 1990 (in ihrer jeweils gültigen Fassung) zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen (MRLs) für pharmakologische Stoffe in Nahrungsmittel tierischen Ursprungs. Entsprechend dieser Verordnung dürfen nur Tierarzneimittel eingesetzt werden, die pharmakologische Stoffe enthalten, für die Höchstmengen in essbaren Geweben und anderen tierischen Produkten festgelegt wurden, oder aber solche Wirkstoffe, für die keine Höchstmengen erforderlich sind (Anhänge I - IV). Nach Bewertung der Arzneimittelwirkstoffe im MRL-Verfahren erfolgt die Aufnahme einer Substanz in die entsprechenden Anhänge der Verordnung, dort sind die zur analytischen Lebensmitteluntersuchung festgelegten Markerrückstände mit den zugehörigen Rückstandshöchstmengen und die jeweilige Tierart sowie die Zielgewebe für die Rückstandsüberwachung und evtl. Sonderregelungen aufgeführt. Bis jetzt wurden in der Europäischen Union acht Cephalosporine für laktierende Rinder zugelassen (2.2.4) und mit unterschiedlichen Rückstandshöchstmengen in einem Bereich von 20 µg/kg bis 125 µg/kg belegt. Die nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 festgesetzten MRLs für Cephalosporine in Milch sind in Tabelle 2.6 zusammengestellt.

Milcherzeuger sind nach dem Arzneimittelgesetz (AMG, § 58 Anwendung bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen) zur ordnungsgemäßen Anwendung und nach dem LFGB zur Einhaltung der festgesetzten Wartezeiten verpflichtet.

Tabelle 2.6: Höchstmengen (MRLs) für Cephalosporine in Milch (Tierart Rinder) nach der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 Anhang I (Stand April 2004)

<b>Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)</b>	<b>Marker-Rückstand</b>	<b>MRL µg/kg</b>	<b>Sonstige Vorschriften</b>
Cefacetril	Cefacetril	125	Nur zur intramammären Anwendung
Cefalonium	Cefalonium	20	
Cefapirin	Summe von Cefapirin und Desacetylcefapirin	60	
Cefazolin	Cefazolin	50	
Cefalexin	Cefalexin	100	
Cefoperazon	Cefoperazon	50	
Cefquinom	Cefquinom	20	
Ceftiofur	Summe aller den Betalactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessenen Rückstände	100	

Die Halter von der Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren müssen ein Bestandsbuch führen, in dem die Anwendung von Arzneimitteln dokumentiert wird, Tierärzte müssen einen entsprechenden Arzneimittel-Anwendungs- und Abgabebeleg mit der Angabe der einzuhaltenden Wartezeit ausfüllen.

Entsprechend der Milchverordnung (§ 16, Absatz 1 e, in Umsetzung des Artikels 14 der EG-Milchhygienerichtlinie 92/46) sind Be- und Verarbeitungsbetriebe, in denen Milch oder Erzeugnisse auf Milchbasis hergestellt oder behandelt werden, zu betriebseigenen Kontrollen verpflichtet, um sich zu vergewissern, dass diese Produkte nicht mit Antibiotika, die sich beim Verzehr als gefährlich oder schädlich für die menschliche Gesundheit erweisen können, belastet sind. Für diese Untersuchungen sind jedoch weder Probenfrequenz und Probennahmeebene noch die anzuwendenden Untersuchungsverfahren geregelt (HEESCHEN, 1993; SUHREN, 2002a).

Ab 01.01.2006 wird sich eine Wandlung im deutschen Milchrecht vollziehen. Zur Angleichung des europäischen Rechtes regeln auf Grundlage der als Lebensmittelhygiene „Basisverordnung“ geltenden Verordnung (EG) Nr. 178/2002 vom 28. Januar 2002 weitere Verordnungen die lebensmittelhygienischen Anforderungen u.a. auch an Milch und Milcherzeugnisse („EU-Hygiene-Paket“). Sogenannte „Lebensmittel-Unternehmer“ müssen allgemeine hygienische Vorschriften gemäß der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 vom 29. April 2004 (Anhang II, Kapitel IX) und spezielle hygienische Vorschriften gemäß der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 vom 29. April 2004 (Anhang III, Abschnitt IX) erfüllen. Die Verordnung (EG) Nr. 854/2004 vom 29. April 2004 enthält besondere Vorschriften zur amtlichen Überwachung der Kontrollen gemäß o.g. Verordnungen.

Die Milch-Güteverordnung legt die Güteprüfung und die Bezahlung der Anlieferungsmilch fest. Im Rahmen der Güteprüfung müssen nach § 2 Absatz 3 monatlich mindestens zwei<sup>1</sup> Untersuchungen zur Feststellung von Hemmstoffen nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ASU, 1996a), Gliederungsnummer L 01.01-5 (Agar-Diffusions-Verfahren mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*; Brillantschwarz-Reduktionstest = BRT) durchgeführt werden. Werden Hemmstoffe nachgewiesen, wobei eine Identifizierung und Quantifizierung des Hemmstoffes nicht erforderlich ist, erfolgt je positives Untersuchungsergebnis eine Preiskürzung des Milchgeldes um 5 Cent/kg für den betreffenden Abrechnungsmonat.

Die Lebensmittelüberwachung führt die Untersuchungen im Rahmen des nationalen Rückstandskontrollplans durch. Nach der Richtlinie 96/23/EWG wird für jedes EU-Land ein Rückstandskontrollplan zur Überwachung tierischer Erzeugnisse auf Rückstände von gesundheitlich unerwünschten Stoffen bereits von Beginn des Produktionsprozesses an vorgeschrieben und jährlich neu erstellt. Er enthält für jedes Bundesland konkrete Vorgaben über die Anzahl der zu untersuchenden Tiere oder tierischen Erzeugnisse, die zu untersuchenden Stoffe, die anzuwendende Methodik und die Probennahme. Seit 1999 wird u.a. auch Milch nach den EU-weit geltenden Vorschriften kontrolliert.

In Deutschland besteht damit, aufgrund der oben dargestellten rechtlichen Situation, ein zweigleisiges System, da die Hemmstoffuntersuchung im Rahmen der Milchgüteverordnung nicht gleichzusetzen ist mit der Erfassung der Höchstmengen nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90. Während nach Milchgüteverordnung ein positiver Hemmstoffbefund ein Qualitätsmangel ist, der mit Milchgeldabzügen geahndet wird, sind

---

<sup>1</sup> In Hessen werden derzeit vier Untersuchungen pro Monat durchgeführt

nach dem LFGB Lebensmittel, die Antibiotika oberhalb der jeweiligen Höchstmengen enthalten, nicht verkehrsfähig (HEESCHEN, 1993; SUHREN, 2002a+b).

#### **2.3.4 Toxikologische Bedeutungen und gesundheitliche Risiken**

Ein gesundheitliches Risiko stellen, wie bereits unter 2.2.3.5.2 erläutert, immunpathologische Erscheinungen dar, die nach dem Genuss von Lebensmitteln (z.B. Milch) durch darin enthaltene  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Rückstände hervorgerufen werden können (TERPLAN und ZAADHOF, 1975; DEWDNEY und EDWARDS, 1984; DEWDNEY *et al.*, 1991). Jedoch ist eine *de-novo*-Sensibilisierung durch die niedrigen Konzentrationen von Rückständen, wie sie in Lebensmitteln tierischen Ursprungs vorliegen, nicht zu erwarten (TERPLAN und ZAADHOF, 1967; SULLIVAN *et al.*, 1981; DEWDNEY *et al.*, 1991; MOATS, 1999b; SCHWARZ und WERCKENTHIN, 2001).

Ebenso wie beim direkten Einsatz von Cephalosporinen als Arzneimittel (2.2.3.5) wird nach dem Genuss antibiotikahaltiger Lebensmittel als weitere mögliche Gefahr für die menschliche Gesundheit die Veränderungen der Darmflora genannt, auch hier wird angenommen, dass die heute beobachteten maximal erreichten Rückstandskonzentrationen für eine tatsächliche Gefährdung zu niedrig sind (TERPLAN und ZAADHOF, 1967; PAIGE *et al.*, 1997; PAIGE *et al.*, 1999; STAHLMANN und LODE, 2001).

Besondere Aufmerksamkeit gilt seit langem der Entstehung bakterieller Resistenzen, insbesondere der Darmflora, sowie der Übertragung von Resistenzmerkmalen vom Tier auf den Menschen (TERPLAN und ZAADHOF, 1975; JONES und SEYMOUR, 1988; ESPINASSE, 1993; MITCHELL und YEE, 1995; AARESTRUP, 1999; HONKANEN-BUZALSKI und SUHREN, 1999; SCHWARZ und WERCKENTHIN, 2001). Der Einsatz von Antibiotika in der Fütterung und Therapie von Nutztieren kann zur Selektion resistenter Bakterien führen (2.2.3.3), die unter Umständen in Nahrungsmittel gelangen können (PERRETEN *et al.*, 1997; WITTOWSKI, 1999; TEUBER, 2001). Somit werden Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren für die Übertragung von Resistenzen vom Tier auf den Menschen angesehen, dies kann auf verschiedenen Wegen stattfinden: durch das Vorhandensein von Rückständen antibiotischer Stoffe, durch die Übertragung resistenter pathogener Mikroorganismen oder durch die Aufnahme resistenter Anteile der originären Lebensmittelflora und anschließendem Resistenztransfer auf pathogene

Mikroorganismen. SCHWARZ und WERCKENTHIN (2001) sehen – bei sinnvollem Einsatz der Wirkstoffe – keine Gefahren (bei Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeiten) hinsichtlich möglicher Rückstände in Schlachtkörpern und Produkten. Ebenso wie andere Autoren (DESEO, 2000; ERSKINE *et al.*, 2002a) vertreten sie die Auffassung, dass die therapeutische Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe bei Tieren (sofern sie den Grundsätzen der „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln“ entspricht) kaum Gefahren hinsichtlich einer Resistenzentwicklung bei den zu bekämpfenden Infektionserregern in sich birgt. Dagegen halten BRADY *et al.* (1993) es für möglich, dass Antibiotika in Konzentrationen, die den von der US Food and Drug Administration herausgegebenen „safe levels“ entsprechen, noch ein Potential zur Selektion von Antibiotika-resistenten Bakterienstämmen haben. Da grundsätzlich eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit möglich ist, wird ein Monitoring der Resistenzsituation bei relevanten Erregern als sinnvoll erachtet (KLEIN, 1999).

### **2.3.5 Lebensmitteltechnologische Bedeutung**

Rückstände von Cephalosporinen in der Anlieferungsmilch können technologische Störungen bei der Milchverarbeitung bewirken, z.B. bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte durch Wachstumshemmung der dafür notwendigen Starterkulturen. Die Hemmung von Milchsäurebakterien führt zu wirtschaftlichen Verlusten in der Produktion von Käse, Butter, Joghurt und anderen Sauermilcherzeugnissen, bedingt durch Qualitätsminderungen bis hin zur Fehlproduktion (MARTH und ELLICKSON, 1959; TERPLAN und ZAADHOF, 1967; BEYER, 1986; SCHÄLLIBAUM, 1986a; KIRST, 1992; MORETAIN und FROGER, 1995; HONKANEN-BUZALSKI und SUHREN, 1999; KIRST, 1999). Eine Übersichtsarbeit zum Einfluss von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auf technologisch wichtige Keime findet sich bei SUHREN (1996).

## 2.4 Nachweisverfahren

Zum Nachweis der wichtigsten in der Veterinärmedizin gebräuchlichen antibiotisch wirksamen Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurden zahlreiche Analysemethoden entwickelt bzw. modifiziert. Bisher sind mikrobiologische, physikalisch-chemische und immunologische Verfahren beschrieben (OELLERICH, 1984; POSPÍŠILOVÁ und KUBEŠ, 1988; SUHREN und HEESCHEN, 1990; IDF, 1991a; SAMARAJEEWA *et al.*, 1991; BOBBITT und NG, 1992; PORSTMANN und KIESSIG, 1992; SHAIKH und MOATS, 1993; SUHREN und HEESCHEN, 1996; WALTE *et al.*, 1996; RUSSELL, 1997; WERBER und BERGMANN, 1998; KROLL *et al.*, 1999; BOISON, 2001; PETZ, 2001). Es ist jedoch bis heute nicht möglich mit einer einzelnen Methode alle Antiinfektiva auf MRL-Niveau zu erfassen. Integrierte Nachweissysteme versuchen durch Anwendung verschiedener Methoden bzw. Methodenkombinationen eine bestmögliche Erfassung aller Substanzen zu realisieren (HEESCHEN, 1993; SUHREN *et al.* 1994; SUHREN, 2002b; SUHREN und REICHMUTH, 2002).

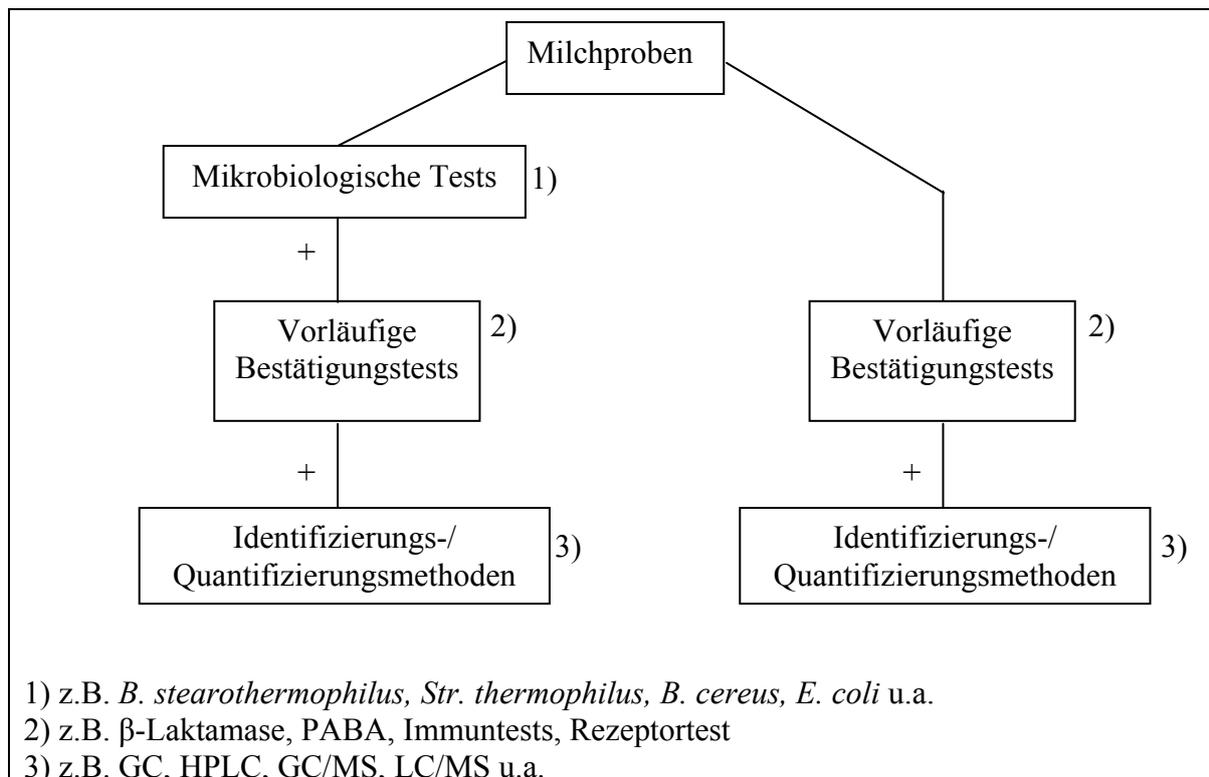


Abbildung 2.6: Nachweis von Antiinfektiva in roher und pasteurisierter Milch, Untersuchungskonzept (gem. VO 2377/90 EWG bzw. Milchhygiene Richtlinie 92/46 EWG; SUHREN, 2002b)

## 2.4.1 Mikrobiologische Verfahren

Das Testprinzip mikrobiologischer Hemmstofftests beruht auf der Reduktion des Wachstums oder der Stoffwechselaktivität bestimmter Testkeime durch Hemmstoffe (MITCHELL *et al.*, 1998). In der Routineuntersuchung von Milch wird häufig der Keim *Bacillus (B.) stearothermophilus* var. *calidolactis* eingesetzt, der eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Penicillinen besitzt (ZAADHOF *et al.*, 1997). Daneben werden *B. subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *B. megaterium*, *Str. thermophilus* und *S. epidermidis* zur Untersuchung auf Hemmstoffe eingesetzt (MITCHELL *et al.*, 1998; NOUWS *et al.*, 1999).

Der Vorteil mikrobiologischer Verfahren liegt in geringen Kosten und in der einfachen Durchführung. Sie eignen sich zum Screening größerer Probenmengen und besitzen ein relativ breites Nachweisspektrum (SUHREN *et al.*, 1996b; SUHREN *et al.*, 1998). Zu den Nachteilen gehören die relativ langen Testzeiten (einige Stunden) und die eingeschränkten Möglichkeiten zur Substanzidentifizierung und -quantifizierung (BOBBITT und NG, 1992; KORSRUD *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 1998). Eine unmittelbare Unterscheidung zwischen Tierarzneimittelrückständen und anderen Hemmstoffen (z.B. originäre Hemmstoffe) ist schwierig (MEYER-BURGMAYER, 1980; CARLSSON und BJÖRCK, 1987), auch eine Abgrenzung zwischen Penicillinen bzw. Cephalosporinen mittels Laktamasen ist nur bedingt möglich (GEDEK, 1977; FRÈRE *et al.*, 1980; MOATS *et al.*, 1986; MEDINA *et al.*, 1998). Die gebräuchlichsten mikrobiologischen Testverfahren sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

### 2.4.1.1 Agar-Diffusions-Verfahren

Bei den verschiedenen Agar-Diffusions-Verfahren wird je nach Testformat das Vorhandensein von Hemmstoffen durch Messen des resultierenden „Hemmhofdurchmessers“ oder durch einen Farbumschlag zugesetzter Indikatoren beurteilt (KOSIKOWSKI und LEDFORD, 1960; KRAACK und TOLLE, 1967). Eine Klassifizierung der Rückstände ist durch verschiedene Zusätze zum Nährboden bedingt möglich ( $\beta$ -Laktamasen bzw. Penicillinase, Cephalosporinase, PABA = Para-Amino-Benzoesäure) (GEDEK, 1977; SUHREN und HEESCHEN, 1996; BRETZ *et al.*, 2004; STEAD *et al.*, 2004). Z.B. GILBERTSON *et al.* versuchten 1995 (a) durch den Zusatz der

Enzyme Penicillinase bzw. Cephalosporinase zum *B. stearothermophilus*-Blättchentest eine Unterscheidung zwischen Ceftiofur und anderen Antibiotika in Milch zu erreichen.

Für die Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe sind in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ASU, 1996a; ASU, 1997a) zwei Methoden zum Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch (L 01.00-6 und L 01.01-5) und zwei Suchverfahren (ASU, 1996b; ASU, 1997b) auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch (L 01.00-11 und L 01.00-62) beschrieben.

#### 2.4.1.1.1 *Blättchentest*

Methode L 01.00-6 (ASU, 1997a) beschreibt den Nachweis von Hemmstoffen mittels eines Blättchentests. Ein mit der zu untersuchenden Milchprobe getränktes Blättchen wird auf einen mit *B. stearothermophilus* beimpften Nährboden gelegt und bebrütet. In den Agar diffundierende Hemmstoffe verhindern das Keimwachstum rund um das Blättchen, so dass sich eine klare Zone (Hemmhof) bildet. Der Durchmesser des Hemmhofes hängt u.a. von Art und Konzentration des Antiinfektivums in der Probe ab.

#### 2.4.1.1.2 *Tests mit Redoxindikator*

Zur Untersuchung von Sammelmilch im Rahmen der Milchgüterverordnung wird in Methode L 01.01-5 (ASU, 1996a) der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) beschrieben. Bei diesem Test handelt es sich um ein Agar-Diffusions-Verfahren unter Verwendung von *B. stearothermophilus* als Testkeim und unter Zusatz von Brillantschwarz als Redoxindikator. Ist die zu untersuchende Milchprobe frei von Hemmstoffen, verschwindet aufgrund des Keimwachstums und der damit verbundenen Reduzierung des Indikators die blaue Farbe der Oxidationsstufe, in Gegenwart von Hemmstoffen unterbleibt dieser Farbumschlag, die gelbe Farbe der Reduktionsstufe wird sichtbar. Die Beurteilung erfolgt anhand der mitanzusetzenden Positivkontrolle (4 µg/kg Benzylpenicillin = 4 ng/ml Penicillin G). Hier werden alle Reaktionen, die mindestens dem blauen Farbton der Positivkontrolle entsprechen als positiv beurteilt. Eine Identifizierung und Quantifizierung der nachgewiesenen Hemmstoffe ist nicht vorgesehen. Zusätzlich zur visuellen Auswertung kann eine instrumentelle Auswertung (UV-Absorption) erfolgen (SCHLIEPHAKE, 1998).

Kommerziell werden solche Testsysteme von verschiedenen Firmen angeboten und vertrieben (BRT Hemmstofftest, BRT MRL-Suchtest, AiM GmbH, München; BR-Test<sup>®</sup> AS Brilliant, BR-Test<sup>®</sup> AS Special, DSM Food Specialties, Delft, Niederlande, ehemals Gist-brocades, Dortmund). Die Nachweisempfindlichkeiten dieser Tests für Cephalosporine sind in Tabelle 2.7 angegeben.

Diesem Verfahren weitgehend ähnlich ist die Methode L 01.00-11 (BRT), sie dient als Suchverfahren (ASU, 1996b) auf Antiinfektiva (unter Berücksichtigung der durch die Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 bestimmten MRLs) in Rohmilch und wärmebehandelter Konsummilch. Der wesentliche Unterschied besteht im Auswertungskriterium, da bei diesem Suchverfahren alle Proben, die nicht die gelbe Reduktionsstufe des antibiotikafreien Kontrollansatzes aufweisen, als positiv bewertet werden. Positive Ergebnisse sollen eine Identifizierung und Quantifizierung des Wirkstoffes nach sich ziehen.

Methode L 01.00-62 (ASU, 1997b) beschreibt ein mikrobiologisches Suchverfahren auf Tetracycline in Milch und die Methode L 01.00-42 (EG) bis 52 (EG) (ASU, 1991) beinhaltet unter VIII. ein mikrobiologisches Referenzverfahren für den Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden (inklusive Identifizierung und quantitativer Bestimmung von Penicillin).

#### 2.4.1.1.3 Tests mit pH-Indikator

Agar-Diffusions-Verfahren zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamidrückständen in Milch, ebenfalls unter Verwendung des Keimes *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* jedoch unter Zusatz von Bromkresolpurpur als pH-Indikator, sind der Delvotest (DSM, Dortmund) und der AIM-96 (Charm Sciences Inc., Lawrence MA USA). Der in verschiedenen Versionen erhältliche Delvotest (Delvotest<sup>®</sup> SP, Delvotest<sup>®</sup> P) beruht auf dem Prinzip, dass Sporen des Testorganismus in einem Agar ohne Nährstoffe verwendet werden, dem später die Milchproben und Nährstofftabletten zugesetzt werden. Durch die beim Wachstum des Testkeimes (in hemmstofffreier Milch) entstehenden sauren Stoffwechselprodukte kommt es zum Farbumschlag des pH-Indikators Bromkresolpurpur von violett nach hellgelb. Der Test wird in verschiedenen Versionen angeboten (Ampullentests, Mikrotitertabletts) und in weiteren Varianten (Premi<sup>®</sup> Test, Delvotest Cow

Test, Delvotest MCS) für die Untersuchung von antimikrobiellen Substanzen in Fleisch, Fleischprodukten, Niere, Fisch und Eiern (GIST-BROCADES Produktinformation, o.J.; NEAVES, 1999; DSM Produktinformation, 2004). Der in verschiedenen Ausführungen (Mikrotiterplattenformat, Röhrchentest: Charm Farm Test-Vial und Charm Farm Test-Mini Vial) erhältliche AIM-96 stellt eine Weiterentwicklung des Charm Farm Tests dar und verwendet im Gegensatz zu den bisher erläuterten Testsystemen ein flüssiges Nährmedium (ZOMER und LIEU 1996; MCGRANE *et al.*, 1996; NEAVES, 1999).

Ebenfalls nach dem gleichen Testprinzip aufgebaut sind der Copan P&S Test (Firma Chr. Hansen, Horsholm Dänemark) unter Verwendung eines nicht näher beschriebenen pH-Indikators sowie der Valio T101 (Valio Ltd; Helsinki, Finnland) unter Verwendung des Keimes *Str. thermophilus* T 101. Ist im Valio T101 die zu untersuchende Milchprobe frei von Hemmstoffen schlägt die blaue Farbe des Kulturmediums durch saure Stoffwechselprodukte des wachsenden Keimes in einen (grau-)gelben Farbton um, in Gegenwart von Hemmstoffen unterbleibt der Farbumschlag. Die Beurteilung erfolgt anhand der mitanzusetzenden Negativkontrolle und einer mitgelieferten Farbskala. Beide Testsysteme werden im Mikrotiterplattenformat oder als Einzeltests angeboten (MUIR und WEST, 1999; Gesellschaft Deutscher Chemiker, GDCH, 2002; COPAN P&S, 2004; DSM Produktinformation, 2004; VALIO Ltd Produktinformation, 2004). Die Nachweisempfindlichkeiten für Cephalosporine der aufgeführten Testsysteme sind in Tabelle 2.7 angegeben.

Tabelle 2.7: Nachweisgrenzen mikrobiologischer Testsysteme für mit MRL belegte Cephalosporine in Milch nach jeweiliger Herstellerangabe\*

Testsystem	Nachweisgrenze Cephalosporin, µg/kg									
	Cefquinom	Cefalexin	Cefacetril	Cefalonium	Cefoperazon	Cefapirin	Cefazolin	Ceftiofur		
BRT Hemmstofftest		300		10	20 - 30	5	25			
BRT MRL-Suchtest	40 - 60	200		5	20	5	25			70 - 100
BR-Test® AS Brilliant	100	25 - 40								
BR-Test® AS Special	90	20 - 30								
Delvotest® SP		60 - 100	20 - 40	10 - 25	60 - 100	5 - 10				50 - 70
Copan P&S	30 - 100	> 45			25 - 50	2,5 - 5	5 - 10			50 - 100
Valio T 101		50 - 100				50 - 100				20 - 30

\*) Produktinformation BRT Hemmstofftest und BRT-MRL: AIM 2004;

Produktinformation BR-Test® AS Brilliant, BR-Test® AS Special und Delvotest® SP: DSM Food Specialties email 12.05.04 und o. J.;

Information Copan P&S: COPAN P&S (2004); MUIR und WEST (1999);

Produktinformation Valio T 101: Valio Ltd Helsinki, Finnland, 2003, Brief 2004

## 2.4.2 Rezeptor-Bindungstests

Die meisten Rezeptor-Bindungstests liegen als sogenannte „Schnelltests“ vor, mit Testzeiten von wenigen Minuten (2 - 15 min.). Im Allgemeinen werden spezifische Bindungsproteine für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika verwendet, deren tatsächliche Natur und Gewinnung Firmengeheimnisse darstellen. Meist dürfte es sich jedoch um mikrobielle Rezeptorproteine bzw. -enzyme handeln. Diese Herkunft bedingt in der Regel eine Inkubation der Tests bei  $> +40$  °C.

Der Vorteil dieser Testsysteme liegt aufgrund ihrer raschen und einfachen Durchführung in der Kontrollmöglichkeit der Milch schon auf Tankwagenebene, so dass im Falle von positiven Ergebnissen Verluste durch kontaminierte Milch gering gehalten werden können und der Produktionsablauf beschleunigt werden kann (DEGELAEN, 1994; JEGERLEHNER, 1995; JUNG, 1995; SISCHO, 1996). Zusätzliche Einsatzmöglichkeiten bieten Schnelltestsysteme in der Ursachenfindung von hemmstoffpositiven Befunden durch den Landwirt oder den Tierarzt in Form von Sammelmilch- oder Einzelgemelksuntersuchungen (MUSSER und ANDERSON, 1999). Als nachteilig ist die mögliche Beeinflussbarkeit der Testergebnisse durch pH-Wert, Zellzahl oder Keimzahl, teilweise unzureichende Testsensitivität und apparativer Aufwand (Heizblock) zu sehen (ANDREW, 1997; KROLL, 2000). Ein weiterer Nachteil dieser Testsysteme ist, dass eine Substanzdifferenzierung innerhalb der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (z.B. Penicilline, Cephalosporine) oder weitere Identifizierung mit diesen Tests nicht möglich ist, da die Bindung an die Rezeptoren gruppenspezifisch erfolgt.

Der SNAP<sup>®</sup> Beta-laktam Test (IDEXX GmbH, Wörrstadt) ist ein indirekter kompetitiver enzymgebundener Rezeptortest (enzyme-linked receptor binding assay). Das Messsignal (Farbintensität) ist somit umgekehrt proportional zur Menge der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in der Probe. Die Testauswertung erfolgt durch Vergleich der blauen Farbe des Probenfeldes mit einem Kontrollfeld (SUHREN und REICHMUTH, 1998a; ZENG *et al.*, 1998; KROLL, 2000). Neben der visuellen Beurteilung kann auch eine instrumentelle Beurteilung erfolgen (FAUST *et al.*, 1994).

Der beta s.t.a.r. (UCB-Bioproducts S.A., Belgien) ist ebenfalls ein indirekt kompetitiver Rezeptor-Bindungstest (in Deutschland vertrieben durch Chr. Hansen GmbH, Nienburg) und ist in zwei Varianten (beta s.t.a.r. 100, beta s.t.a.r. 25) erhältlich. Die Testauswertung erfolgt über einen Vergleich mit einer Referenzbande, die auch als Kontrolle für einen

korrekten Testablauf dient. Neben der visuellen Auswertung ist auch eine instrumentelle Auswertung möglich (GDCH, 2002; CHR. HANSEN GmbH, Produktinformation, 2004).

Ein weiterer, in Deutschland derzeit weniger häufig eingesetzter Rezeptor-Bindungstest für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist der Charm Test (Charm Sciences Inc., USA), der in verschiedenen Ausführungen (Charm MRL BL Test, Charm SL6 Test, Charm SL BL  $\beta$ -lactam Test) angeboten und zum Teil als Einschnitt-Test (ROSA = rapid one step assay) ohne Vorinkubation durchgeführt wird (SALTER *et al.*, 2001; CHARM Sciences Inc. Produktinformation, 2004).

Der in verschiedenen Varianten angebotene instrumentell durchzuführende Charm II Rezeptor-Bindungstest (Charm Sciences Inc., USA) stellt einen Radio-Rezeptorassay dar. Hierbei konkurrieren radioaktiv markierte Antibiotika („Tracer“) mit eventuell in der Probe enthaltenen Antibiotika um spezifische Bindungsstellen (Rezeptoren). Die Hemmstoffkonzentration in der Probe ist umgekehrt proportional zu der Menge des gebundenen radioaktiven „Tracers“, die mit einem Scintillationszähler ermittelt wird. Da die Bindung an die Rezeptoren gruppenspezifisch erfolgt ist eine Differenzierung innerhalb der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nicht möglich (CHARM und CHI, 1982; SCHÄLLIBAUM, 1986b; SUHREN und HEESCHEN, 1987a+b; CHARM und CHI, 1988; IDF, 1991a; MÄRTLBAUER, 1995; KROLL, 2000).

Der Delvo-X-Press<sup>®</sup> (DSM Food Specialties, Delft, Niederlande, Vertrieb in Deutschland durch DSM Food Specialties, Dortmund) ist ein indirekter kompetitiver Enzym-Rezeptortest (enzyme-linked receptor assay), der ebenfalls in verschiedenen Versionen (Delvo-X-Press<sup>®</sup>, Delvo-X-Press<sup>®</sup>  $\beta$ L-II) erhältlich ist. Es handelt sich auch hier um einen rein instrumentellen Test mit einer „workstation“ in die Heizblock, Photometer und Drucker integriert sind (KEIZER *et al.*, 1995; SCANNELLA *et al.*, 1997; KROLL, 2000).

Die Nachweisempfindlichkeiten der erwähnten Testsysteme für Cephalosporine sind in Tabelle 2.8 dargestellt.

### **2.4.3 Enzymatische Tests**

Der sogenannte Penzym Test (UCB-Bioproducts S.A., Belgien; Vertrieb in Deutschland durch Chr. Hansen GmbH, Nienburg) ist ein in zwei Varianten (Penzym, Penzym S) angebotener enzymatischer Test, dessen Testprinzip auf der Inaktivierung eines Enzyms

(Carboxypeptidase, ein Penicillin-bindendes Protein) durch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika beruht. Die zu untersuchende Milchprobe wird mit dem Enzym inkubiert, sind keine  $\beta$ -Laktam-Antibiotika enthalten, bleibt das Enzym aktiv und oxidiert nach Zugabe eines Reagenziengemisches den farblosen organischen Redoxindikator zu einer rosa-orangen Farbverbindung. Enthält die Milchprobe  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, inaktivieren diese das Enzym irreversibel. Die Auswertung erfolgt anhand einer mitgelieferten Farbskala (AMODIO *et al.*, 1986; JAKSCH, 1988; SEYMOUR *et al.*, 1988a; DEGELAEN, 1994; ANONYM, 1995; MORETAIN und FROGER, 1995; SUHREN *et al.*, 1996a; CHR. HANSEN GmbH Sonderdruck o.J. und Produktinformation 2004). Die Nachweisempfindlichkeit dieses Testsystems für Cephalosporine ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

#### 2.4.4 Immunochemische Verfahren

Die Fähigkeit von Antikörpern, spezifische Moleküle (= Antigene) zu erkennen und zu binden dient als Nachweisprinzip in immunochemischen Nachweisverfahren. Um die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion messbar zu machen, werden markierte Reagenzien (Antigene oder Antikörper) verwendet, als Marker können radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) sowie lumineszierende oder fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay, FIA) dienen (EDWARDS *et al.*, 1982; NGO und LENHOFF, 1982; EKINS, 1985; JACKSON und EKINS, 1986; NEWSOME, 1986; CHRISTIE *et al.*, 1988; SMITH, 1989; HARLE und BALDO, 1990a+b; KLEIN *et al.*, 1993; MÄRTLBAUER, 1993; GARCIA *et al.*, 1997). Bei den in dieser Arbeit entwickelten und beschriebenen immunochemischen Verfahren erfolgt die Markierung mittels eines Enzyms, daher werden enzymimmunochemische Verfahren im Folgenden genauer beschreiben.

Enzymimmunochemische Verfahren unterscheiden sich, je nachdem ob eine Trennung zwischen gebundenen und ungebundenen Reagenzien erforderlich ist oder nicht (homogenes Verfahren = separationsfrei; heterogenes Verfahren = mit Separationsschritt) (NGO und LENHOFF, 1981; NGO und LENHOFF, 1982; NAKAMURA und ROBBINS, 1988). Eine Trennung wird durch Bindung von Antigen (oder Antikörper) an Trägermaterialien in Kombination mit Waschschrritten ermöglicht (RITTENBURG, 1989), diese mit Festphasen arbeitenden Verfahren werden als "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) bezeichnet (ENGVALL und PERLMANN, 1971).

Grundsätzlich kann man Enzymimmunoassays (EIAs) in **kompetitive** und **nicht kompetitive** Verfahren einteilen (EKINS, 1989). Nicht kompetitive Verfahren verwenden markierte Antikörper, die im Überschuss zum Antigen vorliegen. Bei kompetitiven Tests hingegen konkurrieren markiertes und unmarkiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen, dieses Verfahren kommt bei niedermolekularen Substanzen, die nur eine Bindungsstelle für Antikörper besitzen, zur Anwendung.

Kompetitive Enzymimmuntests können **direkt** oder **indirekt** durchgeführt werden, in Abhängigkeit von verschiedenen Charakteristika kann eine weitere Unterteilung erfolgen (MÄRTLBAUER, 1992; STANKER und BEIER, 1996). Beim **direkten** Verfahren ist eine begrenzte Zahl spezifischer Antikörper entweder unmittelbar oder über einen zweiten Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik, Double Antibody Solid Phase, DASP) an ein Trägermaterial (meist Mikrotiterplatten) gebunden. Um diese Antikörperbindungsstellen konkurrieren freies und enzymmarkiertes Antigen. Nach ausreichender Inkubationszeit werden ungebundene Reagenzien durch einen Waschschrift entfernt und dann Substrat zugegeben. Der durch das gebundene Enzymkonjugat katalysierte Substratumsatz ist dabei umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen. Im direkten EIA kann die Inkubation von Antiserum (= Antikörpern) mit freiem und mit enzymmarkiertem Antigen entweder **simultan** (gleichzeitig) oder **konsekutiv** (nacheinander, durch Waschschrift getrennt) erfolgen. Die konsekutive Testanordnung kann im direkten ELISA den Vorteil bringen, dass störende Probenmatrixeinflüsse auf das enzymmarkierte Antigen ausgeschlossen werden und so eine Verbesserung der Testempfindlichkeit erreicht werden kann (MÄRTLBAUER, 1988).

**Indirekte** kompetitive Verfahren werden meist wie folgt durchgeführt: Ein Antigen-Protein-Konjugat wird auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) aufgebracht. Die zu untersuchende Probe wird zusammen mit spezifischen Antikörpern darauf inkubiert, dabei konkurrieren die freien Antigene der Probe mit denen der Festphase um die begrenzte Anzahl der Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift (zum Entfernen ungebundener Reagenzien) wird enzymmarkierter Antikörper (beispielsweise gegen Immunglobuline der entsprechenden Tierart, von der die spezifischen Antikörper stammen) zugegeben. Nach ausreichender Inkubationszeit werden ungebundene Reagenzien durch einen weiteren Waschschrift entfernt und dann Substrat zugegeben. Der durch das gebundene Enzymkonjugat katalysierte Substratumsatz ist dabei umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen in der Probe.

Zusätzlich unterscheidet man zwischen **homologer** und **heterologer** Kombination von Antiserum und Enzymkonjugat. Wird ein Hapten zur Immunogensynthese und zur Herstellung des enzymmarkierten Antigens verwendet, entspricht dies einer homologen Kombination. Bei einer heterologen Kombination wird zur Herstellung des Enzymkonjugates entweder ein anderes Hapten verwendet (heterologes Hapten), eine andere Derivatisierungsreagenz (heterologe Brücke) oder eine andere Position am Molekül (heterologe Seite) zur Kopplung verwendet. Die heterologe Testanordnung kann bei geringerer Affinität des Antikörpers für das heterologe, enzymmarkierte Antigen zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit des Testsystems führen (VAN WEEMEN und SCHUURS, 1975; MÄRTLBAUER, 1988; MÄRTLBAUER, 1993).

Der Einsatz immunchemischer Nachweisverfahren in der Lebensmittelanalytik ist schon länger gebräuchlich und findet zunehmend Anwendung und Bedeutung (NEWSOME, 1986; HITCHCOCK, 1988; ALLEN, 1989; RITTENBURG, 1989; SMITH, 1989; SAMARAJEEWA *et al.*, 1991; JACKMAN, 1993; BUSHWAY und FAN, 1995; JOURDAN *et al.*, 1996; STANKER und BEIER, 1996; SPINKS, 2000; FRANEK und HRUSKA, 2005).

#### 2.4.4.1 Fluoreszenzimmunoassay (FIA)

STERNESJÖ und JOHNSON (1995 und 1998) beschreiben ein FIA-Verfahren zur Bestimmung von  $\beta$ -Laktam Antibiotika in Rohmilch. KUMAR *et al.* (1996) entwickelten ein ähnliches fluoreszenzimmunchemisches Verfahren (solid-phase fluorescence immunoassay, SPFIA) zum Nachweis von Penicillinen und Cephalosporinen in Milch und gaben einen Nachweisbereich von 1 - 20 ng/ml für Cefapirin und 1 - 50 ng/ml für Ceftiofur an. Dieses Verfahren ist auch die Basis eines kommerziellen Testsystems, u.a. zum Nachweis von Cephalosporinen in Milch. Dieser sogenannte „Parallux<sup>TM</sup>“ Test (IDEXX Laboratories, Inc., USA) wird in verschiedenen Varianten angeboten (u.a. Beta-Lactam Assay, Ceftiofur Assay). Es handelt sich um einen rein instrumentellen Test (BARBERIO *et al.*, 2001; HUTH *et al.*, 2002; OKERMAN *et al.*, 2003; IDEXX, Produktinformation, 2004). Die Nachweisempfindlichkeit dieses Tests für Cephalosporine ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

#### 2.4.4.2 Enzymimmunoassay (EIA)

Enzymimmunochemische Verfahren zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Einfachheit der Arbeitsschritte aus und eignen sich daher in erster Linie als Screening-Verfahren zur Untersuchung größerer Probenmengen (NEWSOME, 1986; ELLIS, 1996). Als Vorteil gegenüber den mikrobiellen Verfahren ist vor allem die Möglichkeit zur Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände zu nennen. Neben der herkömmlichen Immunisierung von Versuchstieren und der Gewinnung polyklonaler bzw. monoklonaler Antikörper werden auch Ansätze zur Produktion rekombinanter Antikörper zur gezielten Beeinflussung der Spezifität beschrieben (KORPIMÄKI *et al.*, 2002). Zusätzlich zu den klassischen enzymimmunochemischen Verfahren zum Nachweis von Antiinfektiva, die als Mikrotiterplattentests oder Röhrchentests konzipiert sind, führte deren Weiterentwicklung zur Etablierung von Teststreifen und Immunfiltrationstests (SCHNEIDER *et al.*, 1988; SCHNEIDER, 1991; OSTERMEIER *et al.*, 1995; SCHNAPPINGER *et al.*, 1996; VERHEIJEN *et al.*, 2000) sowie zu einer Reihe kommerziell erhältlicher Immuntestkits (SCHNEIDER *et al.*, 1994; vgl. 2.4.2).

Einen Überblick über die Entwicklung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs geben USLEBER *et al.* (1994a). Seither sind in der Literatur enzymimmunochemische Testsysteme zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen (KURZ *et al.*, 1994; DIETRICH *et al.*, 1998; USLEBER *et al.*, 1998; CLIQUET *et al.*, 2001; STRASSER *et al.*, 2000; STRASSER *et al.*, 2003a) bzw. zum spezifischen Nachweis von Penicillin G (JACKMAN *et al.*, 1990; JACKMAN *et al.*, 1991), von Isoxazolyl-Penicillinen (USLEBER *et al.*, 1994b; DIETRICH *et al.*, 1996) und von Penicillin-Metaboliten (ROHNER *et al.*, 1985; LITZ 1995; FLOß *et al.*, 1997; GRUBELNIK *et al.*, 2001) beschrieben worden. Ein enzymimmunologisches Testsystem zum Nachweis von  $\beta$ -Laktam Antibiotika in Milch ist als Röhrchenschnelltest kommerziell erhältlich (IDETEK, 1992; SCHNEIDER *et al.*, 1994).

Beim LacTek Test der Firma IDETEK (IDEXX Laboratories, Inc., USA) handelt es sich um einen kompetitiven Immunrezeptor Test im Röhrchen-Format. Die zu untersuchende Milchprobe wird zusammen mit enzymmarkiertem „Tracer“ in einem mit Antikörperbeschichteten Röhrchen (als Festphase) inkubiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener Anteile wird ein Farbewickler („colour developer“)

zugegeben und die im Spektrophotometer gemessene Farbintensität mit der eines Penicillin-Standards verglichen. Enthält die Milchprobe  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, werden diese an die Antikörper gebunden und verdrängen die enzymmarkierten „Tracer“. Sind in der Milchprobe keine  $\beta$ -Laktam-Antibiotika enthalten, bindet der enzymmarkierte „Tracer“ an die Antikörper und katalysiert die Farbreaktion, deren Intensität somit umgekehrt proportional zur  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Konzentration in der Probe ist. Die Version LacTek  $\beta$ -lactam ist spezifisch für Penicilline, die Version LacTek Cefotiofur dient der Erfassung von Cefotiofur. Auch weitere Varianten zur Erfassung anderer Antibiotika sind erhältlich (IDETEK, 1992; TYLER *et al.*, 1992; BELL und SCANNELLA, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1994; ZENG *et al.*, 1998; NEAVES, 1999). Die Nachweisempfindlichkeit dieses Tests für Cephalosporine ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

Neben der Herstellung von Antikörpern zu Analysezwecken ist die Untersuchung immunologischer Eigenschaften von im Organismus gebildeten Antikörpern nach Aufnahme von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ein wichtiges Gebiet im Bereich der Allergieforschung. In dieser Arbeit soll nicht näher auf diesen Aspekt eingegangen werden. Beispielhaft sei hier lediglich auf die Arbeit von KATSUTANI und SHIONOYA (1993) verwiesen, die durch Immunisierung von Meerschweinchen mit diversen Cephalosporin-Proteinkonjugaten (Cephalothin, Cefaloridin, Latamoxef, Cefazolin, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefotiam und Cefoperazon) eine spezifische Immunantwort auslösten. Mit diesen Antikörpern wurden Kreuzreaktivitätsstudien mit anderen Cephalosporinen und Penicillinen durchgeführt, durch Vergleich der Reaktivität mit Antibiotika-Ovalbumin-Konjugaten oder durch Vergleich der Reaktivität mit dem reinen Antibiotikum. In einem indirekten ELISA verwendeten sie ein nicht näher beschriebenes Antibiotika-Protein-Konjugat als Plattenbeschichtung und Peroxidase-markierte Anti-Meerschweinchen IgG als Konjugat. Der Vergleich erfolgte anhand der 30 %-Inhibitionsdosis. Es zeigte sich eine deutliche Kreuzreaktivität zwischen den Cephalosporinen Latamoxef, Ceftazidim, Cefotiam, Cefotaxim, Cefoperazon und Penicilloyl  $\epsilon$ -aminocaproat, und wenig Kreuzreaktivität mit Benzylpenicillin.

Im Folgenden wird auf die Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren für die in dieser Arbeit verwendeten Cephalosporine Cefalexin und Cefotiofur näher eingegangen, eine Zusammenstellung findet sich in Tabelle 2.9. Allen diesen Verfahren gemeinsam sind relativ aufwendige Synthesereaktionen, die zu Herstellung von Immunogenen verwendet wurden.

Tabelle 2.8: Nachweisgrenzen in kommerziellen Tests für mit MRL belegte Cephalosporine in Milch nach jeweiliger Herstellerangabe\*

Testsystem	Nachweisgrenze Cephalosporin, µg/kg							
	Cefquinom	Cefalexin	Cefacetil	Cefalonium	Cefoperazon	Cefapirin	Cefazolin	Ceftiofur
Beta s.t.a.r. 100	< 20			7,5 - 15 <sup>G</sup>	5 - 8 <sup>G</sup>	8 - 16	40 - 60	75 - 150
SNAP <sup>®</sup> Beta-laktam Test	20	20 - 25	50	3 - 5	10 - 15	10 - 12	15 - 20	5 - 7
Charm ROSA SL6 Test						18,7		37,5
Charm ROSA SL BL β-lactam Test						13,7		46,2
Charm MRL BL						5 - 10	10 - 20	50 - 100
Penzym		20 - 40 <sup>A/D</sup>		10 - 15 <sup>A/D</sup>		5 - 7		40 - 70
Penzym S		15 - 25 <sup>G/A/D</sup>		4 - 8 <sup>G/A/D</sup>		3 - 5		20 - 40
Charm II	20	30 <sup>G</sup>				3	15	40
Delvo-X-Press <sup>®</sup> /Delvo-X-Press <sup>®</sup> βL-II		25 - 50		3 - 4	5 - 20	4 - 8		4 - 8
Parallux <sup>™</sup>						16,3		33,7
LacTek Test						20		50

\*) Produktinformation Beta s.t.a.r. und Penzym: CHR. HANSEN GmbH, 2004; GDCH, 2002<sup>G</sup>; ANONYM, 1995<sup>A</sup>; DEGELAEN, 1995<sup>D</sup>;  
 Produktinformation Charm SL6, Charm SL β lactam, Charm MRL, Charm II: CHARM Science Inc.: Internet Homepage 2004; GDCH, 2002<sup>G</sup>;  
 Produktinformation Snap<sup>®</sup>: IDEXX Laboratories, email 14.01.05;  
 Produktinformation Delvo-X-Press<sup>®</sup>, Delvo-X-Press<sup>®</sup> βL-II: KROLL, 2000; DSM Food Specialties email-12.05.04;  
 Produktinformation LacTek Test: IDETEK, 1992; SCHNEIDER *et al.*, 1994;  
 Produktinformation Parallux<sup>™</sup>: IDEXX Laboratories, Internet Homepage, Food Safety Net<sup>™</sup> 2004 und HUTH *et al.*, 2002

BLACKMORE *et al.* meldeten 1988 eine Methode zur Herstellung Antigen-wirksamer Protein-Hapten-Konjugate zur Erzeugung entsprechender Antikörper beim Europäischen Patentamt an. Zur Immunogensynthese wurde ein wasserlösliches Cefalexin-Ovalbumin-Konjugat mit (Isobutyl)Chloroformat präzipitiert und so in eine wasserunlösliche Form überführt. Durch Immunisierung von Schafen mit diesem Immunogen konnten sie Antikörper gewinnen. Diese wurden zum Nachweis von freiem, nicht-derivatisiertem Cefalexin in Kuhmilch (unter Verwendung von einem nicht näher beschriebenen enzymmarkierten Cefalexin) in einen kompetitiven ELISA eingesetzt.

KITAGAWA *et al.* beschrieben (1988a) ein enzymimmunchemisches Nachweisverfahren für Cefalexin. Zur Herstellung der beiden zur Immunisierung verwendeten Cefalexin-Protein-Konjugate wurde Cefalexin mit N-(*m*-maleimidobenzoyl)Succinimid (MBS) derivatisiert und entweder an BSA (bovines Serumalbumin) oder Mercaptosuccinyl-bovines Serumalbumin (MS-BSA) gekoppelt. Unter Verwendung der Doppelantikörpertechnik setzten sie als markiertes Antigen  $\beta$ -D-Galaktosidase mittels N-( $\gamma$ -maleimidobutyryloxy)Succinimid an Ceflexin gekoppelt im EIA ein. Die durch die Immunisierung von Kaninchen mit dem jeweiligen Cefalexin-BSA-Konjugat gewonnenen Antikörper reagierten außer mit Cefalexin auch mit Cefalothin (MBS-Serum: 0,32 %; MBS-MS-Serum: 126,7 %), Cefaloglycin (MBS-Serum: 1,01 %; MBS-MS-Serum: 23,0 %) und in geringem Maße auch mit Cefazolin, Ampicillin und Penicillin G (MBS-Serum: im Bereich von 0,001 - 0,018 %; MBS-MS-Serum: im Bereich von 0,1 - 0,4 %). Die Nachweisgrenze für Cefalexin lag bei 0,12  $\mu$ g/ml in Milch. KITAGAWA *et al.* beschrieben zudem (1988b) die Anwendung dieses enzymimmunchemischen Nachweisverfahrens für Cefalexin in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, unter Verwendung des oben beschriebenen MBS-MS-Serums. In diesem Testsystem wurde eine Nachweisgrenze für Cefalexin mit 30 ng/ml für Milch, 60 ng/g für Eier und 400 ng/g für Geflügelfleisch erzielt.

KACHAB *et al.* beschrieben 1992 ein immunchemisches Nachweisverfahren für Cefalexin. Zur Herstellung des zur Immunisierung verwendeten Cefalexin-Protein Konjugates wurde Cefalexin in einer mehrstufigen Reaktion zu Hetacephalexin-carboxymethylester derivatisiert und mittels 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (= EDC) an BSA gekoppelt. Analog dazu wurde ein Hapten-keyhole limpet hemocyanin (KLH)-Konjugat als Beschichtungsantigen für die Festphase hergestellt. Die durch Immunisierung von Kaninchen mit diesem Cefalexin-BSA Konjugat gewonnenen

Antikörper reagierten außer mit Cefalexin auch mit dem Hapten (Hetacephalexin) selbst, mit Cefaclor, Cefalexinsäure, Hetacefadroxil, Cefadroxil, Cefaglycin, 7-ADCA (7-aminodesacetoxycephalosporanic acid) und zeigten keine messbare Kreuzreaktivität mit Penicillinen (Benzylpenicillin, Ampicillin, Ticarcillin, Phenthicillin, Flucloxacillen) beim Vergleich der entsprechenden 50 %-Inhibitionsdosis.

ROSE *et al.* beschrieben 1995 einen indirekten kompetitiven ELISA zum Nachweis von Ceftiofur und DFC. Zur Immunogensynthese wurde Ceftiofur (Cef) entweder mit Sulfosuccinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)-butyrat (SMPB) oder mit N-[( $\gamma$ -maleimido-butyryl)oxy]sulfosuccinimid-Ester (GMBS) an thioliertes Ovalbumin (OVA-S) gekoppelt. Hydrolytisch aus Ceftiofur (nach CHAPMAN und OWEN, 1950) hergestelltes Desfuroylceftiofur (desCef) wurde an Maleimid-aktiviertes KLH (KLH-SMCC) gekoppelt und durch Immunisierung von Mäusen mit OVA-S-SMPB-Cef, OVA-S-GMBS-Cef bzw. KLH-SMCC-desCef konnte eine spezifische Immunantwort erzielt werden. Diese spezifischen Antikörper wurden in einen indirekten kompetitiven ELISA eingesetzt, unter Verwendung von BSA Konjugaten bzw. thiolierten bovinen Serumalbumin (BSA-S) Konjugaten als Festphasenantigene (deren Herstellung erfolgte analog zur Immunogensynthese: BSA-S-SMPB-Cef; BSA-S-GMBS-Cef, BSA-SMCC-desCef) und Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat. In diversen homologen und heterologen Kombinationen wurde die kompetitive Hemmung mit Ceftiam, Ceftriaxon, Cefuroxim und Ceftazidim untersucht, es wurden 50 %-Inhibitionsdosen im Bereich von 15 - 700 ng/ml festgestellt. Nach Angabe der Autoren erwies sich KLH-SMCC-desCef als bestes Immunogen, wenn BSA-S-GMBS-Cef als Beschichtungsantigen im Assay verwendet wurde.

Die gleiche Arbeitsgruppe (ROSE *et al.*, 1996a) stellte unter Verwendung des Immunogens KLH-SMCC-desCef monoklonale Antikörper (Cef-68 und Cef-116) her und setzte diese zum Nachweis von Ceftiofur in einem indirekten ELISA ein (ROSE *et al.*, 1996b). Als Beschichtungsantigen benutzten sie in einer homologen Testanordnung das oben beschriebene BSA-SMCC-desCef Konjugat für erste Screening Versuche und in einer heterologen Testanordnung das BSA-S-GMBS-Cef Konjugat für kompetitive Inhibitionsversuche unter Verwendung von Anti-Maus-IgG-Peroxidase als enzymmarkiertes Konjugat. Die Autoren gaben für Ceftriaxon und Cefotaxim ähnliche 50 %-Inhibitionsdosen wie für Ceftiofur (Cef-68: 32,33 ng/ml; Cef-116: 0,33 ng/ml) an, Ceftiam und Cefuroxim zeigten eine 10 - 100fach geringere Kreuzreaktivität. Die anderen

getesteten Cephalosporine (Ceftazidim, Cefalothin, Cefoxitin, Cefazolin, Cefadroxil, Cefmandol, Cephadrin, Cephapirin, Cefaclor, Cefsulodin, Cefoperazon) bzw. Penicilline (Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Penicillin G) ergaben keine kompetitive Inhibition bei einer Konzentration von 1000 ng/Kavität. In weiteren Veröffentlichungen dieser Arbeitsgruppe gaben die Autoren eine Nachweisgrenze von Ceftiofur in tierischen Geweben und Flüssigkeiten von 0,3 ng/ml (BUCKLEY und STANKER, 1996) bzw. Ceftiofur und DFC in Rohmilch von 1 ng/ml (STANKER *et al.*, 1996) an.

STANKER *et al.* beschrieben 1998 die Entwicklung eines kompetitiven ELISA zum Nachweis von Ceftiofur und Ceftiofur-Metaboliten in Milch. Sie verwendeten dabei den von ROSE *et al.* (1995 und 1996b) mit dem Immunogen KLH-SMCC-desCef hergestellten monoklonalen Antikörper (Cef-116). Dabei wurde Cefteram mittels EDC an BSA gekoppelt und in einer heterologen Testanordnung als Beschichtungsantigen verwendet (BSA-EDC-Cefteram), mit Anti-Maus-IgG-Peroxidase als enzymmarkiertes Konjugat. Ceftiofurhaltige Milchproben wurden zur Minimierung von Matrixeffekten 1:1000 in Puffer verdünnt und im Konzentrationsbereich von 30 µg/ml bis 1 µg/ml eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Probenverdünnung beschrieben die Autoren für Ceftiofur in Milch eine Nachweismöglichkeit von 1 µg/ml. Der Vergleich mit Ergebnissen der HPLC-Analyse ließ die Autoren vermuten, dass der Antikörper sowohl Ceftiofur als auch Ceftiofur-Metaboliten (Desfuroylmetaboliten und DFC-Protein-Konjugate) binden kann.

#### 2.4.4.3 Kombinierte Verfahren

MEYER *et al.* (1999) und ZHI *et al.* (2001) beschrieben die Kombination immunologischer Verfahren (ELISA) mit elektroforetischen Verfahren (flow injection immunoanalysis, FIIA) zum Nachweis von Cefalexin in Milch. Durch Immunisierung von Kaninchen mit Cefalexin, welches mittels EDC an N-hydroxysuccinimid-Succinat (NHS-Succinat) aktiviertes keyhole limpet hemocyanin (KLH) gekoppelt wurde, konnten sie eine spezifische Immunantwort erzielen. Diese Antikörper setzten sie zum Nachweis von Cefalexin im direkten ELISA ein unter Verwendung von Cefalexin (mittels EDC an alkalische Phosphatase gekoppelt) als enzymmarkiertes Antigen (Cefalexin-AP). Zusätzlich wurden diese Antikörper auf ein Trägermaterial eines Immunreaktors (mit Detektor und Arbeitselektroden) aufgebracht und unter Verwendung des Cefalexin-AP

Tabelle 2.9: Immunchemischer Nachweis von Cephalosporinen in Milch

<b>Substanz</b>	<b>Art des Antikörpers (immunisierte Tierart)</b>	<b>Testform</b>	<b>Nachweisbarkeit in Milch</b>	<b>Referenz</b>
Cefalexin	polyklonal (Schaf)	ELISA	k.A.	BLACKMOORE <i>et al.</i> (1988)
Cefalexin	polyklonal (Kaninchen)	ELISA	0,12 µg/ml	KITAGAWA <i>et al.</i> (1988a)
Cefalexin	polyklonal (Kaninchen)	ELISA (DASP)	30 ng/ml	KITAGAWA <i>et al.</i> (1988b)
Cefalexin	polyklonal (Kaninchen)	ELISA	k.A.	KACHAB <i>et al.</i> (1992)
Cefalexin	polyklonal (Kaninchen)	Kombiniertes Verfahren (ELISA+FIIA)	1 µg/l	MEYER <i>et al.</i> (1999); ZHI <i>et al.</i> (2001)
Ceftiofur+DFC	polyklonal (Maus)	ELISA	k.A.	ROSE <i>et al.</i> (1995)
Ceftiofur	monoklonal (Maus)	ELISA	wenige µg/ml	ROSE <i>et al.</i> (1996b)
Ceftiofur+DFC	monoklonal (Maus)	ELISA	1 ng/ml	STANKER <i>et al.</i> (1996)
Ceftiofur	polyklonal (Ziege)	FIA (SPFIA)	1 - 50 ng/ml	KUMAR <i>et al.</i> (1996)
Ceftiofur+Metaboliten	monoklonal (Maus)	ELISA	1 µg/ml	STANKER <i>et al.</i> (1998)

Legende:

- k.A. = keine Angabe;  
DASP = Double Antibody Solid Phase-Technik, Doppelantikörpertechnik;  
DFC = Desfuoylceftiofur;  
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, Enzymimmunttest;  
FIIA = flow injection immunoanalysis;  
SPFIA = solid-phase fluorescence immunoassay, Festphasen-Fluoreszenzimmunoassay

Konjugates die Substratumsetzung als amphoterer Signal in einer Fließzelle gemessen. Die Autoren stellten keine Kreuzreaktivität der Antikörper mit Penicillin G, Amoxicillin und Cloxacillin fest und gaben eine Nachweisgrenze für Cefalexin von 1 µg/l in Milch an.

## **2.4.5 Physikalisch-chemische Verfahren und elektrochemische Verfahren**

Zu den physikalisch-chemischen Methoden zum Nachweis von Antibiotika- und Sulfonamid-Rückständen zählen spektrophotometrische, colorimetrische, chromatographische und elektrophoretische Verfahren. Die größte Bedeutung kommt den chromatographischen Verfahren zu (BOBBITT und NG, 1992; SHAIKH und MOATS, 1993).

### **2.4.5.1 Chromatographische Verfahren**

Chromatographische Methoden sind in der Lage, geringe Rückstandsmengen zu spezifizieren und zu quantifizieren, sie finden daher breite Anwendung in der Referenzdiagnostik und als Bestätigungstests. Ein Einsatz in der Routinediagnostik oder zum Screening größerer Probenmengen ist aufgrund der hohen Kosten für die Analysegeräte, die Anforderungen für hochqualifiziertes Personal und eine intensive Probenaufbereitung nur begrenzt möglich (BYGRAVE *et al.*, 1995; MITCHELL *et al.*, 1998). Die Auftrennung der einzelnen Substanzen erfolgt mittels Dünnschicht- (DC, thin-layer chromatography = TLC), Gas- (GC) oder Flüssigkeitschromatographie (z.B. Hochdruckflüssigkeitschromatographie); wobei als Detektionsverfahren meist UV-Absorption, Fluoreszenz oder die Massenspektrometrie verwendet werden (BLANCHIN *et al.*, 1987; BOBBITT und NG, 1992; BOISON, 1992; SHAIKH und MOATS, 1993; LUO *et al.*, 1997; SØRENSEN *et al.*, 1997; HELLER und NGOH, 1998; SCHENCK und CALLERY, 1998; HELLER *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2000).

#### 2.4.5.1.1 *Dünnschichtchromatographie (DC)*

Dieses Verfahren beschreibt die Trennung von Substanzen mit Hilfe geeigneter Laufmittel (mobile = bewegliche Phase) an einer stationären Phase, dabei wird eine Auftrennung der Substanzen z.B. nach ihrer Polarität erreicht. Die Detektion erfolgt beispielsweise mittels UV-Detektion oder mittels Fluoreszenz-Messung (EULITZ *et al.*, 1965). Die Auftrennung von Antibiotika wie den Cephalosporinen mit diesem Verfahren ist schwierig, da einzelne Cephalosporine nur wenig Unterschiede in ihrer Polarität zeigen, amphoter sind und ihre fehlenden chromophoren oder fluorophoren Eigenschaften es schwierig machen sie mit direkten Methoden zu erfassen (DASENBROCK und LACOURSE, 1998). Eingesetzt wird dieses Verfahren u.a. bei pharmakologischen Studien (SULLIVAN *et al.*, 1969; VANDAMME und VOETS, 1972; CHEN, 1986; AGBABA *et al.*, 1998; CORAN *et al.*, 1998; MARZO und DAL BO, 1998; MISZTAL *et al.*, 1998; BHUSHAN und THIONG'O, 2002). Beispielsweise YU *et al.* (1977) entwickelten ein Verfahren zur Detektion von Cefalexin in biologischen Proben (Serum) mittels Fluoreszenz-Messung und gaben eine Nachweisgrenze von 0,01 µg/ml an.

#### 2.4.5.1.2 *Flüssigkeitschromatographie (LC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS)*

Bei der Flüssigkeitschromatographie (Liquid chromatography, LC) wird eine Probe (Substanzgemisch) in einem flüssigen Lösungsmittel gelöst und mit einem Eluenten (Flüssigkeit = mobile Phase) über eine stationäre Phase (Säule oder planare Schicht) geschickt. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) stellt eine Weiterentwicklung der Säulenchromatographie dar, wobei ein höherer Druck angewendet werden kann. Die aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften wirkenden Absorptions- oder Verteilungskräfte führen zur Elution der Substanzen in der für sie charakteristischen Retentionszeit. Die Detektion der Substanzen kann auf vielfältige Weise erfolgen, u.a. durch Messung der UV-Absorption, der Fluoreszenz oder auch massenspektrometrisch (EULITZ *et al.*, 1965).

Das Prinzip der Massenspektrometrie ist es, aus organischen oder anorganischen Substanzen Ionen bzw. Fragmente zu erzeugen (z.B. durch Beschuss mit Elektronen, Ionen oder Photonen, durch elektrische Felder oder thermisch). Diese Ionen werden nach Masse

und Ladung getrennt, registriert und im charakteristischen Massenspektrum dargestellt. (EULITZ *et al.*, 1965). Einige Beispiele für den Einsatz dieser Verfahren sind Reinheitsprüfungen, Identifikation und Quantifikation z.B. in biologischen Flüssigkeiten (Plasma, Urin) (LECAILLON *et al.*, 1982; ROUAN *et al.*, 1983; ROUAN, 1985; CHAN *et al.*, 1986; NAJIB *et al.*, 1987; MOORE *et al.*, 1991; YUN *et al.*, 1998; MUSSER *et al.*, 2001) sowie pharmakologische und synthetische Prozesse (WOUTERS *et al.*, 1984; SCHÜGERL und SEIDEL, 1988; HSU *et al.*, 1995; HSU *et al.*, 1996; FARAG, 1998; PÉHOURCQ und JARRY, 1998; TENCONI *et al.*, 1999; WU *et al.*, 1999; TSAI *et al.*, 2000; GALLO MARTÍNEZ *et al.*, 2002).

Der flüssigkeitschromatographische Nachweis von Antibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs ist auch heute noch wenig in der Routineanalytik zu finden, obwohl die HPLC aufgrund der überlegenen Trennleistung und Nachweisempfindlichkeit zur Analytik von Arzneimittelrückständen optimal wäre (BOBBITT und NG, 1992; SHAIKH und MOATS, 1993; MACNEIL, 2000; SMYTH, 2003). Als Ursache hierfür sind die relativ hohen Kosten anzusehen.

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für den flüssigkeitschromatographischen Nachweis von Cephalosporinen in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs beschrieben (LEROY *et al.*, 1989; JAGLAN *et al.*, 1990; MACINTOSH, 1990; TYCZKOWSKA *et al.*, 1991; MOATS, 1993; STRAUB und VOYKSNER, 1993; SNIPPE *et al.*, 1994; BECONI-BARKER *et al.*, 1995b; BECONI-BARKER *et al.*, 1996a; MOATS *et al.*, 1998; MOATS und BUCKLEY, 1998; NAVARRE *et al.*, 1999; OKKER *et al.*, 2002; FAGERQUIST und LIGHTFIELD, 2003; HORNISH *et al.*, 2003; PAYNE *et al.*, 2004). Nachteilig bei diesen Verfahren ist der relativ hohe Aufwand bei der Probenvorbereitung und der insgesamt hohe Kostenaufwand. Daher werden diese Verfahren derzeit in der Routineanalytik kaum eingesetzt. In Tabelle 2.10 sind neuere in der Literatur beschriebene Verfahren für den Nachweis der in dieser Arbeit verwendeten Cephalosporine Cefalexin und Ceftiofur in Milch aufgeführt.

Tabelle 2.10: Flüssigkeitschromatographischer Nachweis von Cefalexin bzw. Cefotiofur (und Metaboliten) in boviner Milch

Nachgewiesene Substanz	Methode	Detektion	Nachweisbarkeit	Referenz
Cefalexin	LC	254 nm	k.A.	HENDRIX <i>et al.</i> (1993)
Cefotiofur+Metaboliten	LC	C:289,6 nm DFC:265,8 nm DFC-Dimer:271,4 nm	50 ng/ml	TYCZKOWSKA <i>et al.</i> (1993)
Cefotiofur	LC-ESP-MS		3 - 5 ng/ml	STRAUB <i>et al.</i> (1994)
Cefotiofur	LC-ES-MS		1 - 100 ng/ml	TYCZKOWSKA <i>et al.</i> (1994)
	LC	290 nm	k.A.	
Cefotiofur	LC	295 nm	k.A.	HARIK-KAHN und MOATS (1995)
Cefotiofur	LC	295 nm	1 - 5 ng/ml	MOATS und HARIK-KAHN (1995)
Cefotiofur	LC	295 nm	k.A.	HARIK-KAHN und MOATS (1996)
Cefotiofur	LC	210 nm	< 10 ng/ml	ZOMER <i>et al.</i> (1995)
Cefotiofur	LC	293 nm	4 - 7 ng/ml	MCNEILLY <i>et al.</i> (1996)
Cefotiofur+Metaboliten	HPLC	k.A.	k.A.	MOATS und BUCKLEY (1996)
Cefotiofur	HPLC	k.A.	10 ng/ml	ZOMER <i>et al.</i> (1996)
Cefotiofur	LC	k.A.	1 - 2 ng/ml	MOATS (1997)
Cefotiofur	LC-MS/MS		10 ng/ml	HELLER und NGOH (1998)
Cefotiofur	LC-ES-MS		10 - 25 ng/ml	KEEVER <i>et al.</i> (1998)
Cefotiofur	HPLC	290 nm	k.A.	MOATS und ROMANOWSKI (1998)
Cefalexin	HPLC	248 nm	0,30 µg/ml	PATEL <i>et al.</i> (1998)
Cefotiofur		290 nm	2,5 - 4 ng/ml	SCHERMERHORN <i>et al.</i> (1998)
Cefotiofur	HPLC	290 nm	k.A.	STANKER <i>et al.</i> (1998)
DFC		270 nm	k.A.	
DFC-Cystein		270 nm	k.A.	

Fortsetzung Tabelle 2.10:

Nachgewiesene Substanz	Methode	Detektion	Nachweisbarkeit	Referenz
Cefalexin	HPLC	260 nm	k.A.	MOATS (1999a)
Ceftiofur		290 nm	k.A.	
Ceftiofur	LC-MS/MS		< 2 ng/ml	VOYKSNER und LEE (1999)
Cefalexin	LC-MS/MS		5 - 25 µg/kg	DAESELEIRE <i>et al.</i> (2000a+b)
Ceftiofur			1 - 6 µg/kg	
Ceftiofur	HPLC	270 nm	7 µg/kg	SØRENSEN und SNOR (2000)
Ceftiofur	LC-MS SIM		1 ng/ml	BRUNO <i>et al.</i> (2001)
Ceftiofur+Metaboliten	HPLC	k.A.	15 - 50 µg/kg	EMEA (2002a)
Ceftiofur	LC-MS/MS		0,4 ng/ml	HOLSTEGE <i>et al.</i> (2002)
Ceftiofur-Metaboliten	LC-MS/MS		96,1 - 101,2 µg/kg	BECKER <i>et al.</i> (2003)
Cefalexin	LC-MS/MS		1 - 4 µg/l	GHIDINI <i>et al.</i> (2003)
Ceftiofur-Metaboliten	LC	266 nm	0,015 - 0,050 µg/ml	HORNISH <i>et al.</i> (2003)
DFC	HPLC	k.A.	0,05 - 0,1 µg/ml	SMITH <i>et al.</i> (2004) nach Beconi-Barker (1995b)
Ceftiofur+Metaboliten	LC-MS/MS		166 - 239 µg/kg	MAKESWARAN <i>et al.</i> (2005)

Legende:

DFC = Desfuroyleftiofur; k.A. = keine Angabe;

HPLC = high performance liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie;

LC = liquid chromatography, Flüssigkeitschromatographie;

LC-ES(P)-MS = liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie;

LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie;

LC-MS SIM = liquid chromatography-mass spectrometry selected ion monitoring, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

#### 2.4.5.2 Elektrochemische und sonstige Verfahren

Bei diesen Analyseverfahren wandern molekular-disperse oder kolloid-disperse Teilchen einer Lösung (Elektrophorese) oder auf Trägermaterial (Elektropherographie) im elektrischen Feld. Durch Adsorption oder Abspaltung von Ionen sind diese kolloid-dispersen Teilchen an ihrer Oberfläche gegenüber der Flüssigkeit aufgeladen. Beim Anlegen einer Spannung wandern sie entsprechend ihrer Ladung zu den Elektroden und können somit getrennt werden (EULITZ *et al.*, 1965). In der Literatur ist die Kombination elektrophoretischer Verfahren mit immunologischen Verfahren, z.B. zum Nachweis von Cefalexin in Milch beschrieben (vgl. 2.4.4.3). CUTTING *et al.* kombinierten 1995 eine Agarosegelelektrophorese mit mikrobiologischen Methoden (unter Verwendung des Keimes *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*) zum Nachweis von Cefapirin und Ceftiofur in Milch auf Höhe der US-amerikanischen „safe levels“ (Cefapirin 20 ng/ml, Ceftiofur 50 ng/ml).

Die Kombination verschiedener Verfahren wird ebenfalls zur Entwicklung von Biosensoren genutzt (RICHTER, 1993; STRASSER, 2003; STRASSER *et al.*, 2003b; CACCIATORE *et al.*, 2004; KNECHT *et al.*, 2004). Beispielsweise DILLON *et al.* (2003) gaben für ein solches Verfahren einen Detektionsbereich für Cefalexin in Milch von 244 - 3906 pg/ml an.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Verfahren sind im Methodenentwicklungsstadium zu sehen und finden in der Routineuntersuchung von Lebensmitteln derzeit keine Anwendung.

### **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Material und Geräte**

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

Aceton (reinst)	(Merck KGaA, 1.00013)
Ammoniumsulfat	(Riedel de Haën, 31119)
Borax	(Sigma Chemie GmbH, B-9876)
Casein-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
Citronensäure-1-Monohydrat	(Merck KGaA, 1.00244)
Dimethylsulfoxid (99,9 %)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 472301)
Dithioerythritol	(Sigma Chemie GmbH, D-9680)
Ethanol (absolut, zur Synthese)	(Merck KGaA, 8.18760)
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid	(Sigma Chemie GmbH, E-7750)
Freund'sches Adjuvans, komplett	(Sigma Chemie GmbH, F-5881)
Glutardialdehyd	(Sigma Chemie GmbH, G-5882)
2-Jodacetamid (97 %)	(Aldrich Chemie GmbH, I-670-9)
Kaliumchloridlösung (3 mol/l)	(Merck KGaA, 1.04817)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
Natriumhydroxidplättchen	(Merck KGaA, 1.06498)
Kaliumhydroxidplättchen	(Merck KGaA, 1.05021)
keyhole limpet hemocyanin (KLH)	(Calbiochem-Novabiochem Corporation, 374805)
Magermilchpulver	(Merck KGaA, 1.5363)
Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP)	(Roche Diagnostics, 814407)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009))
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
Schwefelsäure (95 - 97 %)	(Merck KGaA, 1.00731)
Serumalbumin, bovin (BSA)	(Sigma Chemie GmbH, A-9647)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma Chemie GmbH, P-1379)

Wasserstoffperoxid (Merck KGaA, 1.07209)  
Xylol (Merck KGaA, 1.08681)

### 3.1.2 Antibiotika und Penicillinase

Amoxicillin (Sigma Chemie GmbH, A-8523)  
Ampicillin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, A-9518)  
Cefacetril-Natriumsalz (Novartis, 97120050Z1)  
Cefaclor (Sigma Chemie GmbH, C-6895)  
Cefadroxil (Sigma Chemie GmbH, C-7020)  
Cefalexin-Hydrat (Sigma Chemie GmbH, C-4895)  
Cefalonium (Schering-Plough, Bray)  
Cefapirin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-8270)  
Cefazolin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-5020)  
Cefmandol-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-7145)  
Cefmetazol-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-6048)  
Cefoperazon-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-4292)  
Cefotaxim-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-7912)  
Cefoxitin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-4786)  
Cefsulodin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-8145)  
Ceftiofur-Hydrochlorid (Pharmacia/Upjohn)  
Ceftiofur-Natriumsalz (Pharmacia/Upjohn)  
Ceftriaxon (Sigma Chemie GmbH, C-5793)  
Cefuroxim-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-4417)  
Cefquinom-Sulfat (Intervet Innovation GmbH)  
Cephradin (Sigma Chemie GmbH, C-8395)  
Cloxacillin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, C-9393)  
Cloxacillin-Monohydrat (ICN, 1-8008540530)  
Dicloxacillin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, D-9016)  
Oxacillin-Natriumsalz (Sigma Chemie GmbH, O-1002)  
Penicillin G-Natriumsalz (Benzylpenicillin) (Sigma Chemie GmbH, PEN-NA)  
Penicillin G-Kaliumsalz (Benzylpenicillin) (Sigma Chemie GmbH, PEN-K)  
Penicillinase, 10.000.000 IU/ml (Difco Laboratories, 234610)

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

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

0,05 mol/l Boratpuffer (pH 9,0)

2 % Casein-PBS-Lösung (20 g Natriumcaseinat/l PBS)

1 % Casein-PBS-Lösung (10 g Natriumcaseinat/l PBS)

0,21 mol/l Citratpuffer (mit Zusatz von 3,15 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 3,9)

1 mol/l Natronlauge (NaOH)

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

1 mol/l Schwefelsäure

#### Jodacetamidlösung:

40 mg 2-Jodacetamid in 1 ml PBS

#### Magermilchpulverlösung

10 % Magermilchpulver in A. dest. rekonstituiert

#### Reaktionslösung für Ceftiofur-Derivatisierung (nach BECONI-BARKER *et al.*, 1995b):

0,4 % Dithioerythritol in Boratpuffer (pH 9,0)

#### Substratlösung für Meerrettichperoxidase (nach GALLATI und PRACHT, 1985):

20 Teile Citratpuffer mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

#### Tetramethylbenzidinlösung:

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

#### Waschlösung:

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

### 3.1.4 Immunreagenzien

#### Polyklonale Antikörper:

Kaninchen-Anti-Maus-IgG

(DAKO A/S, Z 0259)

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP

(DAKO A/S, P 0217)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG

(Sigma Chemie GmbH, R-2004)

### 3.1.5 Versuchstiere

Für die Immunisierung wurden acht Kaninchen der Rasse Chinchilla-Bastard (grau, weiblich, 1,5 bis 2,5 kg; Fa. Charles River, D-Kisslegg) verwendet.

### 3.1.6 Probenmaterial

Hemmstofffreie Vollmilch, 3,8 % Fettgehalt, pasteurisiert und homogenisiert, wurde im Handel erworben. Hemmstofffreie Rohmilch stammte von Rindern aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer, der Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Dr. K. Doll, Frankfurter Straße 110, 35392 Gießen. Hemmstoffpositive Anlieferungsmilchproben stammten aus der Untersuchungstätigkeit des Hessischen Verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. (HVL). Diese Proben wurden bis zur Untersuchung bei  $-18\text{ °C}$  bzw.  $-80\text{ °C}$  gelagert, am Tag der Untersuchung im Wasserbad bei  $+37\text{ °C}$  aufgetaut und am gleichen Tag untersucht. Hemmstoffpositive Rohmilch stammte von einer mit Excenel<sup>®</sup> RTU behandelten Kuh, (Alter: vier Jahre, Schwarz-Bunte-Holstein, zwei Kalbungen) ebenfalls aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen. Nähere Daten zu den Tieren waren nicht verfügbar.

### 3.1.7 Geräte

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH)
Heizbad GFL	(MAGV GmbH,
Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic)
Heizrührer RCT basic	(IKA <sup>®</sup> Labortechnik)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät KS 250 basic	(IKA <sup>®</sup> Labortechnik)
Multi-Blok <sup>®</sup> Heater20501 IDCE	(Lab Line Instruments)
Minishaker MS	(IKA <sup>®</sup> Labortechnik)
pH-Meter inolab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Corporation)

Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Sartorius Waage Basic plus	(Sartorius AG)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	(Eppendorf AG)
Variable 12-Kanalpipette 10-100 µl, 30-300 µl	(Eppendorf AG)
Variable 12-Kanalpipette 50-300 µl	(Finnpipette Labsystems)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Zentrifuge Sepatech Varifuge RF	(Heraeus-Christ GmbH)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH)

### 3.1.8 Sonstige Materialien

#### Mikrobiologische Tests: Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT):

BRT Hemmstofftest (AiM, Analytik in Milch GmbH)

#### Rezeptorschnelltests:

beta-s.t.a.r.25 und beta-s.t.a.r.100 (Chr. Hansen GmbH, 600897)

SNAP<sup>®</sup> Beta-laktam Test (IDEXX GmbH, 06-01916-04)

#### Enzymimmuntests:

Mikrotiterplatten (Immunoplate, Nunc GmbH, 439454)

Dialysierschläuche 6 mm Durchmesser (Servapor, 44139)

Dialysierschläuche 6 mm Durchmesser (Visking, 44104)

Dialysierschläuche 16 mm Durchmesser (Visking, 44110)

#### pH-Indikatorpapier:

Universalindikator pH 0 - 14 (Merck KGaA, 1.09535)

#### Datenverarbeitung:

Ridawin Software (Version 1.38) (r-Biopharm, GmbH)

Magellan Software (2.5) (Tecan Austria GmbH)

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Herstellung der Immunreagenzien**

Cephalosporine wie Cefalexin und Ceftiofur wirken aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes *per se* nicht immunogen (Haptene) und wurden daher, um in Versuchstieren eine spezifische Immunantwort mit Antikörperbildung hervorrufen zu können, an ein Trägerprotein ausreichender Größe (KLH) gekoppelt.

Für die Durchführung direkter kompetitiver Enzymimmuntests wurden enzymmarkierte Antigene hergestellt, dafür wurde Cefalexin bzw. Ceftiofur jeweils an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt.

Zur Etablierung kompetitiver indirekter Testverfahren wurde außerdem ein Festphasenantigen aus dem entsprechenden Zielantibiotikum (Ceftiofur) und einem Trägerprotein (BSA) synthetisiert.

#### 3.2.1.1 Herstellung der Cephalosporin-Konjugate

##### 3.2.1.1.1 *Kopplung von Cefalexin bzw. Ceftiofur an KLH*

Zur Kopplung von Cefalexin bzw. Ceftiofur an KLH wurde die Glutardialdehydmethode eingesetzt. Das Kopplungsprinzip besteht in einer Vernetzung freier Aminogruppen durch die Aldehydgruppen des homobifunktionellen Kopplungsreagens Glutardialdehyd (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969). In einer einstufigen Reaktion wurden das entsprechende Antibiotikum sowie KLH jeweils in PBS und Glutardialdehyd (GA) in A. dest. gelöst, in einem molaren Verhältnis von 10000:1:10000. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde der Kopplungsansatz zur Abtrennung von nicht gebundenem Antibiotikum sowie von überschüssigem Kopplungsreagenz dreimal gegen 6 l PBS dialysiert. Die verwendeten Mengen an Antibiotika und an Protein sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

##### 3.2.1.1.2 *Kopplung von Ceftiofur an BSA*

Unter Verwendung von wasserlöslichem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid, ED(P)C, C) wurden Ceftiofur-Natriumsalz sowie Ceftiofur-Hydrochlorid jeweils an BSA gekoppelt. Da bei dieser einstufigen Reaktion

sowohl über freie Carboxylgruppen als auch über primäre Aminogruppen des Haptens eine Verknüpfung mit dem Trägerprotein möglich ist, bestehen sowohl für Ceflexin als auch für Ceftiofur jeweils zwei mögliche Kopplungsstellen (Abbildung 2.5). Bei dieser einstufigen Reaktion entsteht an der Carboxylgruppe des Dihydrothiazin-Ringes der Cephalosporine bzw. des Proteins durch das im Überschuss zugegebene Carbodiimid ein O-Acylisoharnstoff, der mit freien Aminogruppen des Proteins bzw. des Cephalosporins unter Bildung eines Amids und eines Harnstoffderivates reagiert (GOODFRIEND *et al.*, 1964; WONG, 1993). Bei den Kopplungen wurde ein molares Verhältnis von Antibiotikum zu Protein von 100:1 eingehalten. In einem typischen Reaktionsansatz wurden Antibiotikum und Carbodiimid jeweils in A. dest. gelöst und zu wässriger BSA-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde 24 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt und anschließend dreimal gegen 6 l PBS dialysiert. Die verwendeten Mengen an Antibiotikum und an Protein sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Analog zu der unter 3.2.1.1.1 beschriebenen Kopplungsmethode mittels Glutardialdehyd wurde Ceftiofur-Natriumsalz an BSA gekoppelt. Bei den Kopplungen wurde ein molares Verhältnis von Antibiotikum zu Protein von 100:1 eingehalten. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde der Kopplungsansatz dreimal gegen 6 l PBS dialysiert. Die verwendeten Mengen an Antibiotikum und an Protein sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

#### 3.2.1.1.3 *Kopplung von Cefalexin bzw. Ceftiofur an HRP*

Mit der unter 3.2.1.1.2 beschriebenen Kopplungsmethode unter Verwendung von wasserlöslichem Carbodiimid wurden Cefalexin sowie Ceftiofur jeweils an HRP gekoppelt (molares Verhältnis von Antibiotikum zu Protein von 100:1). In einem typischen Reaktionsansatz wurden Antibiotikum und Carbodiimid im Überschuss jeweils in A. dest. gelöst und zu wässriger HRP-Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde der Kopplungsansatz dreimal gegen 6 l PBS dialysiert. Die verwendeten Mengen an Antibiotikum und an Enzym sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Kopplung der Cephalosporine Cefalexin oder Ceftiofur an Proteine

Substanz	Antibiotikum			Makromolekül			Zusätze
	Menge (mg)	Lösungs- mittel	Menge (ml)	Bezeichnung	Menge (mg)	Lösungs- mittel	
<u>Glutardialdehydmethode</u>							
Cefalexin	14,8	PBS	2,0	KLH	20,0	PBS	2,0 + 160 µl 2,5 % GA-A.dest.-Lösung
CeftiofurNa	22,0	PBS	2,0	KLH	20,0	PBS	2,0 + 160 µl 2,5 % GA-A.dest.-Lösung
CeftiofurNa	22,0	PBS	2,0	BSA	27,2	PBS	2,0 + 160 µl 2,5 % GA-A.dest.-Lösung
<u>Carbodiimidmethode</u>							
Cefalexin	21,1	A.dest.	5,0	HRP	23,0	A.dest.	1,5 + 11,0 mg C in 0,5 ml A.dest.
CeftiofurNa	31,4	A.dest.	5,0	HRP	23,0	A.dest.	1,5 + 11,0 mg C in 0,5 ml A.dest.
CeftiofurNa	31,4	A.dest.	5,0	BSA	39,0	A.dest.	1,5 + 11,0 mg C in 0,5 ml A.dest.
CeftiofurHCl	32,2	A.dest.	5,0	BSA	39,0	A.dest.	1,5 + 11,0 mg C in 0,5 ml A.dest.

Legende:

- BSA = bovines Serumalbumin;  
 C = 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid;  
 GA = Glutardialdehyd;  
 HCl = Hydrochlorid;  
 HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase;  
 KLH = keyhole limpet hemocyanin;  
 Na = Natriumsalz;  
 PBS = phosphate buffered saline, Phosphatpuffer (vgl. 3.1.3)

### 3.2.1.1.4 Charakterisierung der Konjugate

Der Proteingehalt der Antigen-Enzym-Konjugate wurde photometrisch anhand einer Eichgeraden für HRP ermittelt, die durch Messung der Extinktion in einem Konzentrationsbereich von 16 - 1000 µg/ml in PBS bei 403 nm erstellt wurde. Die Quantifizierung des Gehaltes an KLH bzw. BSA in den Protein-Konjugaten wurde lediglich abgeschätzt, da aufgrund der geringen Reinheit von KLH (ca. 60 %) bzw. der Überlagerung der Absorptionsmaxima von BSA mit demjenigen der Cephalosporine bei 280 nm eine genaue Quantifizierung nicht möglich war. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 dargestellt.

Die UV-Spektren äquimolarer Mengen Antigen-Protein-Konjugat und des entsprechenden unmodifizierten Proteins wurden in einem Bereich von 190 - 350 nm ermittelt und die Differenz:

$$\begin{aligned} & \text{Extinktion}_{\text{Konjugat}} \text{ bei Wellenlänge } x \\ & - \text{Extinktion}_{\text{Protein}} \text{ bei Wellenlänge } x \end{aligned}$$

errechnet. Die Wellenlänge  $x$  entspricht dabei dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Antibiotikums (Cefalexin:  $\lambda_{\text{max}}$  263 nm; Ceftiofur:  $\lambda_{\text{max}}$  293 nm, Abbildung 3.1).

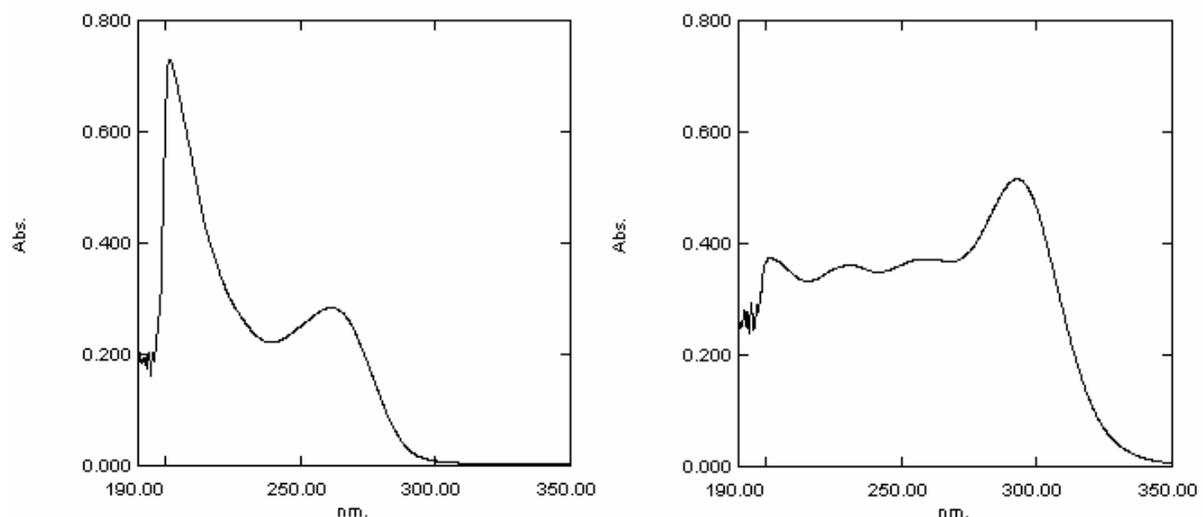


Abbildung 3.1: UV-Spektren von Cefalexin (links: 10 µg/ml in PBS) und Ceftiofur (rechts: 10 µg/ml in PBS)

Das ermittelte „Differenzspektrum“ äquimolarer Mengen Antigen-Protein-Konjugat und des entsprechenden unmodifizierten Proteins wurde mit dem Spektrum des jeweiligen Antibiotikums verglichen und der Antibiotikagehalt der Konjugate photometrisch anhand einer Eichgeraden für Cefalexin (Konzentrationsbereich von 1953 - 125000 ng/ml in PBS; bei 262 nm) bzw. einer Eichgeraden für Ceftiofur (Konzentrationsbereich von 1953 - 31250 ng/ml in PBS; bei 293 nm) ermittelt.

### 3.2.1.2 Gewinnung spezifischer Antiseren

#### 3.2.1.2.1 Immunisierung

Mit den in 3.2.1.1.1 beschriebenen KLH-Konjugaten wurden jeweils vier Kaninchen (vgl. 3.1.5) immunisiert. Die in PBS gelösten Immunogene wurden mit komplettem Freund'schem Adjuvans (1 + 3 Volumenteile) emulgiert. Die Proteinkonzentration der Emulsionen betrug jeweils 4,4 mg/ml. Zur Grundimmunisierung wurden jeweils vier Kaninchen je 2 ml Emulsion auf ca. 20 Stellen am Rücken verteilt intracutan appliziert (NIESCHLAG *et al.*, 1975). Die Restimulierungen erfolgten durch subcutane oder intramuskuläre Injektion der gleichen Immunogen-Zusammensetzungen und -Dosen in der 17. Woche (Cefalexin-KLH) bzw. in der 12., 16. und 32. Woche (Ceftiofur-KLH). Das Immunisierungsschema ist in Tabelle 3.2 angegeben. Der jeweilige Zeitpunkt der Restimulierungen ist zudem aus den Abbildungen 4.4 und 4.5 ersichtlich.

Tabelle 3.2: Immunisierungsschema

<b>Kaninchen (Nr.)</b>	<b>Antibiotikum-Protein-Konjugat (Kopplungsmethode)</b>	<b>Zeitpunkt der Restimulierung (Woche nach Grundimmunisierung), Injektionsart</b>
1, 2, 3, 4	Cefalexin-KLH (Glutardialdehyd)	17. Woche, s.c.
5, 6, 7, 8	Ceftiofur-KLH (Glutardialdehyd)	12. Woche, i.m. 16. Woche, s.c. 32. Woche, s.c.

#### 3.2.1.2.2 Serumgewinnung

Ab der zweiten Woche nach der Grundimmunisierung wurde den Tieren in ein- bis zweiwöchigem Abstand aus der *Arteria auricularis magna* Blut entnommen. Das Serum wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (bei 1942 x g), 20 min, +4 °C) gewonnen und ohne weitere Aufbereitung bei -18 °C aufbewahrt.

#### 3.2.1.2.3 Überprüfung des Immunisierungsverlaufs

Die Titerbestimmung erfolgte mit einer modifizierten "Double Antibody Solid Phase"-Technik (DASP) (MÄRTLBAUER *et al.*, 1988). Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Sigma Chemie) in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer (3.1.3) beschichtet (100 µl/Kavität) und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach entfernen der Flüssigkeit wurden die Platten 30 min mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung und Entfernen der Flüssigkeit („Ausschlagen“/„Trockenschlagen“ der Platten) wurden von jedem Antiserum im Doppelansatz Verdünnungsreihen pipettiert (in PBS, 50 µl/Kavität). Nach Zugabe der entsprechenden Enzymkonjugat-Lösung (50 µl/Kavität), verdünnt in 1 % Casein/PBS (Cefalexin-HRP: 1500 ng HRP/ml; Cefotiofur-HRP: 25 µg HRP/ml), wurde 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und leichter Bewegung inkubiert. Nach einem Wasch- und Trocknungsschritt wurde Substratlösung (3.1.3) (100 µl/Kavität) zugegeben. Die Enzymreaktion wurde nach 8 - 20 min mit Schwefelsäure (1 mol/l; 100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Als Titer wurde die Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab. Zum Vergleich wurde jeweils Präimmunserum (Serum, das vor der Immunisierung der entsprechenden Kaninchen gewonnen wurde) mituntersucht.

Die Titerbestimmung der mit Cefotiofur immunisierten Kaninchen erfolgte zusätzlich mittels eines indirekten ELISA (MÄRTLBAUER, 1992). Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Cefotiofur-(Natriumsalz)-C-BSA in einer Konzentration von 3 µg/ml in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Platten „ausgeschlagen“ und 30 min mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) abgesättigt, dreimal mit Waschlösung gewaschen und „trockengeschlagen“. Von jedem Antiserum wurden im Doppelansatz Verdünnungsreihen

in PBS (100  $\mu$ l/Kavität) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (unter Lichtausschluss bei leichter Bewegung). Nach einem weiteren Wasch- und Trocknungsschritt wurde die entsprechende Enzymkonjugat-Lösung (100  $\mu$ l/Kavität; Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 3250 ng HRP/ml), verdünnt in 1 % Casein/PBS, zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Wasch- und Trocknungsschritt wurde Substratlösung (100  $\mu$ l/Kavität) zugegeben. Die Enzymreaktion wurde nach 8 - 20 min mit Schwefelsäure (1 mol/l; 100  $\mu$ l/Kavität) gestoppt und die Farbintensität bei 450 nm gemessen. Als Titer wurde wiederum die Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab. Zum Vergleich wurde jeweils Präimmenserum mituntersucht.

#### 3.2.1.2.4 *Auswahl der am besten geeigneten Antiseren*

Die gewonnenen Antiseren gegen Cefalexin und Ceftiofur wurden während der gesamten Immunisierungsdauer in zwei- bis vierwöchigem Abstand auf ihre Eignung für den Nachweis des jeweiligen Antibiotikums getestet. Dazu wurde in einer Modifikation der in 3.2.1.2.3 beschriebenen Doppelantikörpertechnik in Mikrotiterplatten Antiserumverdünnungen (in PBS, 35  $\mu$ l/Kavität) gegen Enzymkonjugatverdünnungen (in 1 % Casein/PBS, 35  $\mu$ l/Kavität) mit und ohne Antibiotikumzusatz (35  $\mu$ l/Kavität in PBS, Konzentrationen 1  $\mu$ g/ml bzw. 100 ng/ml) inkubiert (Abbildung 3.2). Für die weiteren Versuche wurden diejenigen Antiseren gegen Cefalexin bzw. Ceftiofur ausgewählt, die im antibiotikafreien Ansatz Extinktionen von 0,8 - 1,2 Einheiten ergaben (bei möglichst hoher Verdünnung) und den größten Extinktionsunterschied (B/B0) zwischen antibiotikafreiem (B0) und antibiotikahaltigem (B) Ansatz aufwiesen, außerdem wurde auf einen hohen absoluten Titer der Seren Wert gelegt. Die nach diesen Kriterien ausgewählten Einzelseren jedes Tieres wurden jeweils gepoolt und portioniert.

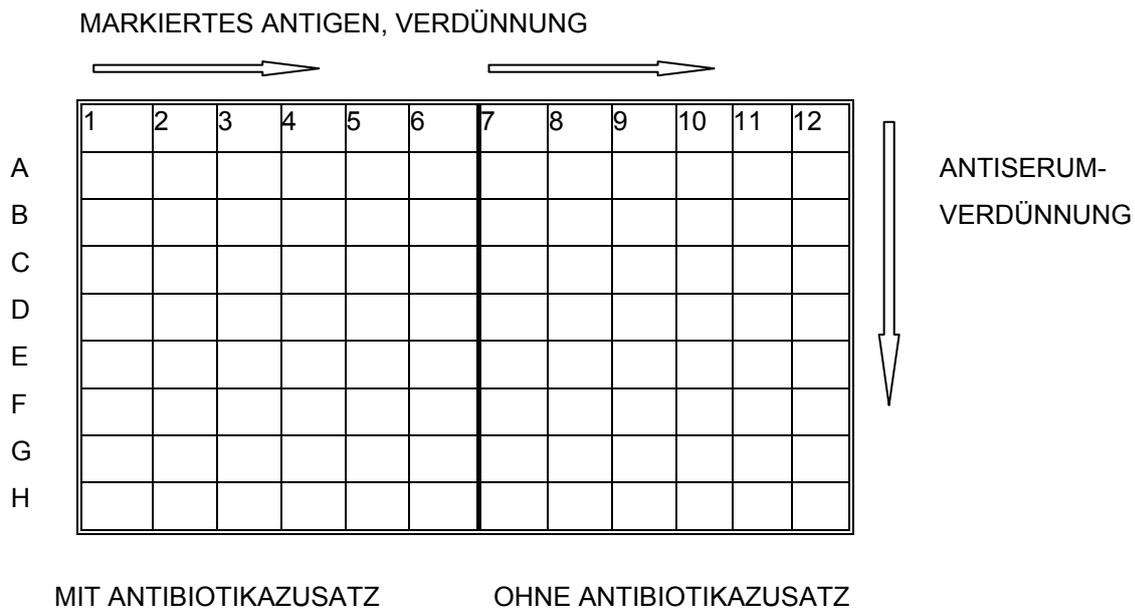


Abbildung 3.2: Prinzipielle Plattenbelegung zur Schachbrett-Titration von Antiserum und markiertem Antigen zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Immunreagenzien

### 3.2.1.2.5 *Aufbereitung der Antiseren*

Die nach den in 3.2.1.2.4 angegebenen Kriterien ausgewählten Antiserumpools gegen Cefalexin wurden, modifiziert nach der Methode von HEBERT *et al.* (1973), mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und gegen PBS (3 x 6 l) dialysiert. Die Quantifizierung des Proteingehaltes der gefällten Antiseren erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm und Berechnung der Konzentration nach folgender Formel:

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{E_P \times 10}{E_R}$$

mit:  $E_P$  = Extinktion der Probe bei 280 nm

$E_R$  = Referenzextinktion einer IgG-Lösung mit  $c = 10 \text{ mg/ml}$  bei 280 nm (13,7)

Die gefällten Antiseren wurden portioniert und bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die nach den in 3.2.1.2.4 angegebenen Kriterien ausgewählten Antiserumpools gegen Ceftiofur wurden ohne weitere Aufarbeitung portioniert und bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.2.2 Herstellung der Antibiotika-Standards**

Zur Herstellung der Antibiotikastandard-Stammlösungen (1 mg/ml) wurden jeweils einige Milligramm eines Antibiotikums in ein 10 ml-Glasfläschchen eingewogen und unter Berücksichtigung des Salzanteils bzw. Reinheitsgrades durch Zugabe eines entsprechenden Volumens PBS gelöst. Um die Löslichkeit zu verbessern, wurden bei den entsprechenden Antiinfektiva pro ml PBS ca. 300 - 500  $\mu\text{l}$  Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Sowohl Stammlösungen als auch Gebrauchslösungen wurden an jedem Untersuchungstag frisch hergestellt. Da nur begrenzte Mengen an Ceftiofur-Reinsubstanz vorhanden waren, wurde diese Stammlösung länger verwendet (maximal vier Wochen). Vorversuche hatten gezeigt, dass dies ohne Zersetzungsverluste bei einer Aufbewahrung bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  möglich war.

Zur alkalischen Hydrolyse von Penicillin G wurde die Stammlösung (1 mg/ml in Methanol) mit 20  $\mu\text{l}$  NaOH (1 mol/l)/ml versetzt und bei Raumtemperatur 24 h inkubiert. Zur alkalischen Hydrolyse weiterer Antibiotika (z.B. Cefalexin, Ceftiofur) wurden jeweils 450  $\mu\text{l}$  Stammlösung mit 50  $\mu\text{l}$  NaOH (1 mol/l) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur (unter leichtem Rühren) inkubiert.

Zur enzymatischen Hydrolyse einiger weiterer Antibiotika wurde 1 ml der jeweiligen Stammlösung mit 20  $\mu\text{l}$  Penicillinase versetzt und bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln 30 min inkubiert.

### **3.2.3 Herstellung der Ceftiofur-Derivate**

#### **3.2.3.1 Derivatisierung von Ceftiofur zu DFC und DFA**

Zur Herstellung der Metaboliten wurde Ceftiofur nach einer modifizierten Methode von CHAPMAN und OWEN (1950) mit Dithioerythritol (DTE) zu Desfuroylceftiofur (DFC) derivatisiert (BECONI-BARKER *et al.*, 1995b; ROSE *et al.*, 1995). Die S-C=O Gruppe des Ceftiofurs reagiert unter Abspaltung von Furansäure, wobei eine SH-Gruppe entsteht. In

einem zweiten Reaktionsschritt reagiert diese freie SH-Gruppe mit Jodacetamid unter Bildung von Desfuroylceftiofur-Acetamid (DFA).

In einem typischen Reaktionsansatz wurden 1 oder 10 mg Ceftiofur (Hydrochlorid) in 10 ml Reaktionslösung (DTE in Boratpuffer, 3.1.3) 15 min im Wasserbad bei +50 °C erhitzt. Zur Synthese von DFA wurde Jodacetamid im Überschuss (40 mg in 1 ml PBS) zu dem oben beschriebenen Ansatz gegeben und 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert.

Diese Lösungen wurden sofort untersucht und bis zur Verwendung in weiteren Versuchen bei -18 °C bzw. -80 °C gelagert.

Das Reaktionsschema, die eingesetzten Mengen an Ceftiofur und Reagenzien sowie die Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 3.3 angegeben.

### 3.2.3.2 Überprüfung der Derivatisierungen

Zur Überprüfung der Derivatisierung wurden photometrisch die Spektren der Substanzen (Ceftiofur, DFC, DFA) gemessen. Die Abspaltung von Furansäure wurde durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kurzwelligen Bereich angezeigt.

Alle drei Substanzen wurden zum Vergleich ihrer mikrobiologischen Aktivität im BRT (gemäß § 64 LFGB Methode L 01.01-5 (ASU, 1996a); siehe 2.4.1.1.2) in einem Konzentrationsbereich von 4 ng/ml bis 10 µg/ml eingesetzt. Des Weiteren wurde nach 3.2.2 alkalisch hydrolysiertes Cefalexin bzw. Ceftiofur eingesetzt. Die alkalische Hydrolyse führt zu einer Öffnung des  $\beta$ -Laktamringes, die mit dem Verlust der mikrobiologischen Aktivität einhergeht. Dies wurde durch Einsatz des hydrolysierten Cefalexins bzw. Ceftiofurs in Konzentrationen von 50, 100, 300 bzw. 600 ng/ml im BRT als mikrobiologisches Testsystem überprüft. Dazu wurden 100 µl/Kavität der entsprechenden Lösung im Doppel- oder Vierfachansatz in die Mikrotiterplatte pipettiert und durchschnittlich 2,5 h im Wasserbad bei +64 °C inkubiert. Die Auswertung (vgl. 2.4.1.1.2) erfolgte visuell (durch Beurteilung des Farbumschlags des Agars) und instrumentell (durch Messung der UV-Absorption bei 450 nm).

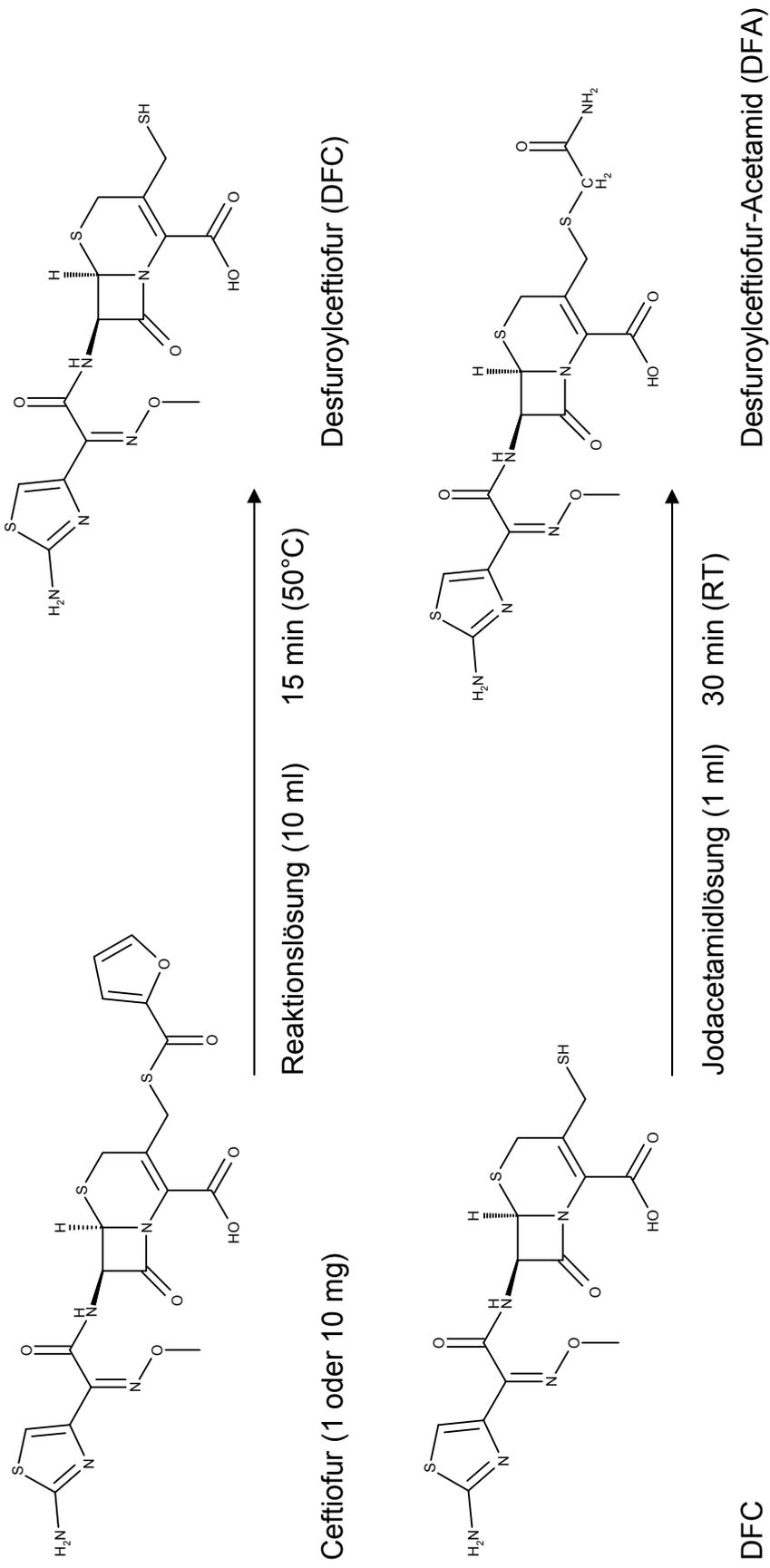


Abbildung 3.3: Reaktionsschema der Derivatisierung von Cefotiofur zu DFC und weiter zu DFA (+50 °C = im Wasserbad, RT = Raumtemperatur)

### **3.2.4 Erstellung und Charakterisierung enzymimmunologischer Nachweisverfahren für CEFALEXIN**

Zur Erstellung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Cefalexin wurden verschiedene Verfahren getestet und verglichen.

#### **3.2.4.1 Kompetitiver direkter simultaner EIA (Beschichtung mit Antiserum)**

Bei dieser Methode wurde Antiserum gegen Cefalexin jeweils direkt zur Beschichtung der Mikrotiterplatten verwendet. Freies und enzymmarkiertes Cefalexin konkurrieren um die begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen (direkt kompetitives Verfahren). Das an die Antikörper gebundene Enzymkonjugat führt zu einem Substratumsatz, der umgekehrt proportional zur Antibiotika-Konzentration in der Probe ist. Die Inkubation der Immunreagenzien erfolgt simultan. Ungebundene Reagenzien werden durch Waschschriffe entfernt. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass Rohserum ohne Aufbereitung verwendet werden kann.

##### *3.2.4.1.1 Durchführung*

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit nach 3.2.1.2.4 ausgewählten und nach 3.2.1.2.5 gefällten Antiseren in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden freie Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung und Entfernen der Flüssigkeit („Ausschlagen“/„Trockenschlagen“ der Platten) wurden gleichzeitig Cefalexin-Standard (50 µl/Kavität) in PBS bzw. 10 % iger Magermilchpulverlösung (in A. dest. rekonstituiertes Magermilchpulver) und Cefalexin-Enzymkonjugat (50 µl/Kavität, in 1 % Casein/PBS) zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei leichter Bewegung inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff zur Entfernung ungebundener Reagenzien und „Trockenschlagen“ der Platten wurde Substratlösung (100 µl/Kavität) zugegeben. Nach etwa 15 min wurde die Umsetzungsreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

#### 3.2.4.1.2 Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems

Die Bestimmung der optimalen Verdünnungen der gefällten Antiseren und des Cefalexin-HRP-Enzymkonjugates erfolgte analog zu der in 3.2.4.1.1 beschriebenen Methode unter Verwendung der in Abbildung 3.2 dargestellten Plattenbelegung. Mikrotiterplatten wurden mit Verdünnungsreihen der gefällten Antiseren von Kaninchen (Kan.) 3 bzw. Kan. 4 beschichtet (1:1000 bis 1:8000) und gegen Enzymkonjugatverdünnungsreihen (Kan. 3: 1:5000 bis 1:50000; Kan. 4: 1:15000 bis 1:120000) titriert (Schachbrett-Titration). Hierbei wurde antibiotikafreier Kontrollansatz gegen antibiotikahaltigen Vergleichsansatz (Kan. 3: 5 ng/ml; Kan. 4: 1 ng/ml) in 10 % iger Magermilchpulverlösung titriert.

Als optimal wurden diejenigen Kombinationen der Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnung angesehen, die bei einer Inkubationszeit von 15 min einen Extinktionswert des antigenfreien Ansatzes von 0,8 - 1,2 sowie den größten Extinktionsunterschied (B/B<sub>0</sub>) zwischen antigenfreiem (B<sub>0</sub>) und antigenhaltigem (B) Ansatz ergaben.

Mit den so ermittelten Kombinationen wurden für Cefalexin (i.A. im Vierfachansatz) im Konzentrationsbereich von 0,026 - 200 ng/ml (Kan. 3) bzw. 0,008 - 60 ng/ml (Kan. 4) Standardkurven sowohl in Puffer (PBS) als auch in 10 % iger Magermilchpulverlösung angelegt. Die für die jeweiligen Cefalexin-Konzentrationen ermittelten Extinktionswerte wurden als Prozentwerte der Extinktion des cefalexinfreien Ansatzes („Leerwert“) ausgedrückt (unter Verwendung der Software „Ridawin“, einer kommerziell erhältlichen, weiterentwickelten Version eines von MÄRTLBAUER *et al.* (1988) beschriebenen Computerprogramms zur Auswertung kompetitiver EIAs). Um Fehlinterpretationen vorzubeugen, wurden bei der Auswertung von Probenmesswerten (3.2.6) anhand der erstellten Standardkurven nur Werte berücksichtigt, die in Extinktionswerte von mehr als 30 % und weniger als 70 % des antibiotikafreien Ansatzes (B/B<sub>0</sub>) resultierten, entsprechend dem quasi-linearen Bereich der Standardkurven. Als Maß für die Empfindlichkeit des jeweiligen Testsystems wurde der 50 %-Wert, d.h. diejenige Antibiotikumkonzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Antigens an die Antikörper um 50 % reduzierte sowie die Nachweisgrenze bestimmt. Die Nachweisgrenze entsprach derjenigen Cefalexin-Konzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Antibiotikums um 30 % reduzierte und damit einen Extinktionswert von 70 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab (Tabelle 4.4).

### 3.2.4.1.3 Spezifität des Testsystems

Zur Bestimmung der Spezifität der verwendeten Antiseren in dem beschriebenen direkten simultanen EIA wurden Wettbewerbsversuche mit anderen Cephalosporinen (Cefapirin, Cefoperazon, Cefazolin, Ceftiofur, Cefaclor, Cefmandol, Cefadroxil, Ceftriaxon, Cefoxitin, Cephadrin, Cefmetazol, Cefotaxim, Cefsulodin, Cefuroxim, Cefquinom, Cefalonium, Cefacetril) und Penicillinen (Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin) durchgeführt. Zudem wurden DFC und DFA (3.2.3) und ebenso (in 3.2.2 beschrieben) durch alkalische Hydrolyse erzeugte Penicillin G-Derivate (BPO = Benzylpenicilloyl) sowie enzymatisch mit Penicillinase hydrolysierte Substanzen (Penicillin G, Cefalexin, Ceftiofur, DFC, DFA) getestet. Grundsätzlich wurden alle Standard- und Extraktionslösungen im Dreifach- oder Vierfachansatz eingesetzt. In einem ersten Versuch wurden die Substanzen in einem Konzentrationsbereich von 100 ng/ml - 1000 ng/ml in PBS eingesetzt. Zeigte sich hier eine Reduktion der Extinktion im Vergleich zum antigenfreien Ansatz, so wurden in weiteren Versuchen Standardkurven der entsprechenden Substanzen (Cefaclor, Cefadroxil, Cephadrin) erstellt. Die Standardkurven wurden analog zu 3.2.4.1.2 im Konzentrationsbereich von 0,026 - 200 ng/ml in 10 % iger Magermilchpulverlösung erstellt, um als Maß für die Kreuzreaktion die 50 %-Werte zu bestimmen. Die Berechnung der relativen Kreuzreaktion (Tabelle 4.5), d.h. das Maß der Reaktion einer Substanz [X] im Testsystem zum Nachweis von Cefalexin [C] erfolgte anhand der ermittelten 50 %-Dosis nach folgender Formel:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{50 \% -Dosis [C]}}{\text{50 \% -Dosis [X]}} \times 100$$

### 3.2.4.2 Kompetitiver direkter simultaner EIA (DASP-Technik)

Bei dieser, bereits unter 3.2.1.2.3 beschriebenen DASP-Technik, werden die spezifischen, gegen Cefalexin gerichteten Antikörper an einen zweiten, gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG), der als Festphase dient, gebunden (direkt kompetitive Testanordnung).

#### 3.2.4.2.1 Durchführung

Zur Durchführung des EIA wurden Mikrotiterplatten mit Ziege-Anti-Kaninchen-IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden freie Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung und „Ausschlagen“ wurden gleichzeitig Antiserum (35 µl/Kavität, in PBS), Cefalexin-Standard (35 µl/Kavität, in PBS bzw. 10 % iger Magermilchpulverlösung) und Cefalexin-Enzymkonjugat (35 µl/Kavität, in 1 % Casein/PBS) zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei leichter Bewegung inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.2.4.1.1 beschrieben.

#### 3.2.4.2.2 Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems

Die Ermittlung der optimalen Verdünnungen der Immunreagenzien erfolgte analog zu der in 3.2.1.2.4 beschriebenen Methode unter Verwendung der in Abbildung 3.2 dargestellten Plattenbelegung. Dabei wurden Antiserumverdünnungsreihen (1:1000, 8 x 1:3 weiterverdünnt) gegen Enzymkonjugatverdünnungsreihen (1:1000, 6 x 1:3 weiterverdünnt) titriert (Schachbrett-Titration), mit und ohne Zusatz des Antibiotikums (1000 ng/ml, in 10 % iger Magermilchpulverlösung).

Als optimal wurden diejenigen Kombinationen der höchsten Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnung angesehen, die den in 3.2.1.2.4 beschriebenen Kriterien am besten genügten.

Mit den so ermittelten Kombinationen wurden für Cefalexin (i.A. im Vierfachansatz) in einem Konzentrationsbereich von 0,098 - 200 ng/ml Standardkurven in 10 % iger Magermilchpulverlösung erstellt. Die für die jeweiligen Cefalexin-Konzentrationen ermittelten Extinktionswerte wurden als Prozentwerte der Extinktion des cefalexinfreien Ansatzes ausgedrückt. Bei der Auswertung von Probenmesswerten (3.2.6) anhand der erstellten Standardkurven wurden nur Verdünnungsstufen berücksichtigt, die in Extinktionswerte von mehr als 30 % und weniger als 70 % des antibiotikafreien Ansatzes (B/B0) resultierten, entsprechend dem quasi-linearen Bereich der Standardkurven (analog zu 3.2.4.1.2, MÄRTLBAUER *et al.* (1988). Als Maß für die Qualität jedes

durchgeführten Tests diene wiederum der 50 %-Wert und die Nachweisgrenze, bestimmt als 70 %-Extinktionswert (Tabelle 4.7).

#### 3.2.4.2.3 *Spezifität des Testsystems*

Ausgehend von den in 3.2.4.1.3 beschriebenen Versuchen wurden Wettbewerbsversuche mit anderen Cephalosporinen (Cefapirin, Cefoperazon, Cefazolin, Ceftiofur, Cefaclor, Cefmandol, Cefadroxil, Ceftriaxon, Cefoxitin, Cephadrin, Cefmetazol, Cefotaxim, Cefsulodin, Cefuroxim) und Penicillinen (Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin) durchgeführt. Die Substanzen wurden typischerweise im Dreifach- oder Vierfachansatz im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml - 1000 ng/ml in PBS in den Test eingesetzt.

### 3.2.5 **Erstellung und Charakterisierung enzymimmunologischer Nachweisverfahren für CEFTIOFUR**

Zur Erstellung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Ceftiofur wurden verschiedene Verfahren getestet und verglichen.

#### 3.2.5.1 Kompetitiver indirekter EIA (Beschichtung mit Antigen)

Prinzipiell konkurrieren bei dieser Methode immobilisierter Analyt (Festphasenantigen) und freier Analyt um eine begrenzte Anzahl Antikörperbindungsstellen. An die Festphase gebundene Antikörper werden danach über einen zweiten, enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen. Zur Herstellung des Festphasenantigens wurde Ceftiofur an das Trägerprotein BSA gekoppelt. Die Herstellung der verschiedenen Festphasenantigene (3.2.1.1.2, Tabelle 4.2) erfolgte zum einen unter Verwendung des gleichen Derivatisierungsreagens und zum anderen unter Verwendung eines anderen Derivatisierungsreagens wie für die Herstellung des Immunogens (3.2.1.1.1).

#### 3.2.5.1.1 *Durchführung*

Zur Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit Cefotiofur-(Natriumsalz)-C-BSA-Konjugat (3.2.1.1.2) in einer Konzentration von 3 µg/ml in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurden freie Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung und „Auswaschen“ wurden gleichzeitig Antiserum (50 µl/Kavität, in PBS) und Cefotiofur-Standard (50 µl/Kavität, in PBS bzw. 10 %iger Magermilchpulverlösung) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei leichter Bewegung inkubiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Reagenzien und „Trockenschlagen“ der Platten wurde als Enzymkonjugat Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP (DAKO) in 1 % Casein/PBS (100 µl/Kavität) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei leichter Bewegung inkubiert. Nach einem erneuten Wasch- und Trocknungsschrift wurde Substratlösung (100 µl/Kavität) zugegeben. Nach etwa 15 min wurde die Umsetzungsreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

#### 3.2.5.1.2 *Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems*

Zur Auswahl der optimalen Kombinationen an Immunreagenzien wurde zuerst die geeignete Konzentration an Festphasenantigen (3.2.1.1.2) und Antiserum ermittelt. Dazu wurden Mikrotiterplatten in einer Modifikation der unter 3.2.5.1.1 beschriebenen Methode mit Verdünnungsreihen der jeweiligen Festphasenantigene (100 µl/Kavität; in Bicarbonatpuffer) in einer Konzentration von 0,041 µg/ml bis 10 µg/ml beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absättigen, Waschen und „Trockenschlagen“ der Platten wurden von jedem Antiserum Verdünnungsreihen (1:100, 6 x 1:3 weiterverdünnt) angelegt und diese (50 µl/Kavität) ohne und mit Antibiotikumzusatz (50 µl/Kavität, 100 ng/ml in PBS) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (unter Lichtausschluss mit leichter Bewegung). Nach einem weiteren Wasch- und Trocknungsschrift wurde die Enzymkonjugat-Lösung (100 µl/Kavität; Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1300 ng HRP/ml; in 1 % Casein/PBS) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Wasch- und Trocknungsschrift wurde Substratlösung (100 µl/Kavität) zugegeben.

Die Enzymreaktion wurde nach 10 - 20 min mit Schwefelsäure (1 mol/l, 100 µl/Kavität) gestoppt und die Farbintensität bei 450 nm gemessen. Für die weiteren Versuche wurde diejenige Kombination ausgewählt, die noch Extinktionen im antibiotikafreien Ansatz von 0,8 - 1,2 Einheiten ergab und den größten Extinktionsunterschied (B/B<sub>0</sub>) zwischen antibiotikafreiem (B<sub>0</sub>) und antibiotikahaltigem (B) Ansatz aufwies. Abbildung 3.2 zeigt die hierfür verwendete Plattenbelegung.

Zusätzlich wurden noch die optimale Konzentrationen des Anti-Kaninchen-IgG HRP bestimmt, dazu wurden Mikrotiterplatten mit Ceftiofur-(Natriumsalz)-C-BSA-Konjugat (3.2.1.1.2) in einer Konzentration von 3 µg/ml (100 µl/Kavität, in Bicarbonatpuffer) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Analog zu der in 3.2.5.1.1 beschriebenen Methode unter Verwendung der in Abbildung 3.2 dargestellten Plattenbelegung wurden Antiserumverdünnungsreihen (beispielsweise 1:1000; 1:1500; 1:2000) gegen Enzymkonjugatverdünnungsreihen (beispielsweise 1:400; 1:800; 1:1200; 1:1600) titriert. Hierbei wurden antibiotikafreier Kontrollansatz gegen antibiotikahaltigen Vergleichsansatz (Kan. 5: 10 ng/ml; Kan. 6: 20 ng/ml) in 10 % iger Magermilchpulverlösung titriert.

Als optimal wurden diejenigen Kombinationen der höchsten Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnung angesehen, die die in 3.2.1.2.4 beschriebenen Kriterien erfüllten.

Mit den so ermittelten Kombinationen wurden Ceftiofur-Standardkurven (i.A. im Vierfachansatz) sowohl in Puffer (PBS) als auch in 10 % iger Magermilchpulverlösung in einem Konzentrationsbereich von 0,247 - 60 ng/ml (Kan. 5) bzw. 0,823 - 200 ng/ml (Kan. 6) angelegt. Die für die jeweiligen Ceftiofur-Konzentrationen ermittelten Extinktionswerte wurden als Prozentwerte der Extinktion des ceftiofurfreien Ansatzes („Leerwert“) ausgedrückt (unter Verwendung der Software „Ridawin“, einer kommerziell erhältlichen, weiterentwickelten Version eines von MÄRTLBAUER *et al.* (1988) beschriebenen Computerprogramms zur Auswertung kompetitiver EIAs). Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen, wurden bei der Auswertung von Probenmesswerten (3.2.6) mittels der erstellten Standardkurven nur Werte berücksichtigt, die in Extinktionswerte von mehr als 30 % und weniger als 70 % des antibiotikafreien Ansatzes (B/B<sub>0</sub>) resultierten, entsprechend dem quasi-linearen Bereich der Standardkurven. Als Maß für die Empfindlichkeit des jeweiligen Testsystems wurde der 50 %-Wert, d.h. diejenige Antibiotikumkonzentration, welche die Bindung des immobilisierten Antigens an die

Antikörper um 50 % reduzierte sowie die Nachweisgrenze bestimmt. Die Nachweisgrenze entsprach dem 70 %-Wert, d.h. diejenige Ceftiofur-Konzentration, welche die Bindung des immobilisierten Antigens um 30 % reduzierte und damit einen Extinktionswert von 70 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab (Tabelle 4.9).

#### 3.2.5.1.3 *Spezifität des Testsystems*

Zur Bestimmung der Spezifität der verwendeten Antisera von Kan. 5 und Kan. 6 in den beschriebenen indirekten EIAs wurden Wettbewerbsversuche mit anderen Cephalosporinen (Cefalexin, Cefapirin, Cefoperazon, Cefazolin, Cefaclor, Cefmandol, Cefadroxil, Ceftriaxon, Cefoxitin, Cephadrin, Cefmetazol, Cefotaxim, Cefsulodin, Cefuroxim, Cefquinom, Cefalonium, Cefacetil) und Penicillinen (Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin) durchgeführt. Ebenfalls wurden wie in 3.2.3 beschrieben hergestelltes DFC, DFA und (wie in 3.2.2 beschrieben) durch alkalische Hydrolyse erzeugte Penicillin G-Derivate (BPO) sowie mit Penicillinase hydrolysierte Substanzen (Penicillin G, Ceftiofur, DFC, DFA) getestet. Grundsätzlich wurden alle Standard- und Extraktionslösungen im Dreifach- oder Vierfachansatz eingesetzt. Die Substanzen wurden im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml - 1000 ng/ml in PBS eingesetzt. Zeigte sich hier eine Reduktion der Extinktion im Vergleich zum Leerwert, so wurden in weiteren Versuchen Standardkurven der entsprechenden Substanzen in 10 % iger Magermilchpulverlösung im Konzentrationsbereich von 4 - 1000 ng/ml (Ceftriaxon, Cefotaxim, Cefuroxim) bzw. 0,5 ng/ml bis 10 µg/ml (DFC) sowie 12 - 3000 ng/ml (DFC, DFA) erstellt (3.2.5.1.1), um als Maß für die Kreuzreaktion die 50 %-Werte zu bestimmen. Die Berechnung der relativen Kreuzreaktion (Tabelle 4.10) erfolgte analog zu 3.2.4.1.3.

#### 3.2.5.2 *Kompetitiver direkter simultaner EIA (DASP-Technik)*

Es wurde versucht auf Basis der DASP, wie bereits unter 3.2.4.2 für Cefalexin beschrieben, ebenfalls ein direktes Testsystem für Ceftiofur zu entwickeln. Hierbei wurde analog zu 3.2.4.2.1 verfahren, jedoch unter Verwendung von Ceftiofur-Antiserum, Ceftiofur-Standard sowie Ceftiofur-HRP-Konjugat.

### **3.2.6 Versuche zur Anwendbarkeit der entwickelten EIAs**

Die Herstellung der Standardgebrauchslösungen und die Dotierung der Proben erfolgte täglich frisch. Grundsätzlich wurden alle Standardlösungen, unverdünnte Milchproben und Probenverdünnungen (typischerweise z.B. 1:3, 1:9, 1:27) im Vierfachansatz in die Tests eingesetzt.

#### **3.2.6.1 Nachweis von CEFALEXIN in künstlich kontaminierter Milch**

Zur Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit der entwickelten EIAs zum Nachweis von Cefalexin-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Milch) wurden Milchproben mit Cefalexin künstlich kontaminiert und in die kompetitiven direkten simultanen EIAs unter Verwendung der Antiserumpools von Kan. 3 bzw. Kan. 4 eingesetzt.

##### *3.2.6.1.1 Künstliche Kontaminierung und Probenvorbereitung*

Milch (pasteurisierte, homogenisierte Konsummilch (3,8 % Fett) oder frische Rohmilch) wurde mit Cefalexin dotiert, in den Konzentrationen entsprechend dem zehntel, viertel, halben, einfachen und doppelten MRL-Wert (10, 25, 50, 100 oder 200 ng/ml). Vor dem Einsatz in den EIA wurde die Milch durch Zentrifugieren (1942 x g, +4 °C, 15 min) entfettet.

##### *3.2.6.1.2 Durchführung der EIAs zum Nachweis von Cefalexin*

Die künstlich kontaminierten Milchproben wurden in die EIAs (3.2.4.1) eingesetzt, als Negativkontrolle wurde stets eine antibiotikafreie Milchprobe mituntersucht. Die entsprechenden Cefalexin-Standards und Probenverdünnungen wurden in 10 % iger Magermilchpulverlösung angefertigt. Vorversuche hatten gezeigt, dass zur Vermeidung unspezifischer Matrixeffekte die Milchproben entfettet und Verdünnungen in 10 % iger Magermilchpulverlösung angelegt werden müssen.

### 3.2.6.1.3 *Auswertung der EIAs zum Nachweis von Cefalexin*

Zur automatisierten Auswertung der EIAs erfolgte die Belegung der Mikrotiterplatten nach einem standardisierten Pipettierschema. Die vom Autoreader ermittelten Messwerte wurden direkt auf den Computer übertragen und unter Verwendung der Software „Ridawin“ (eine kommerziell erhältliche, weiterentwickelte Version des von MÄRTLBAUER *et al.* (1988) beschriebenen Computerprogramms zur Auswertung kompetitiver EIAs) ausgewertet. Anhand der Standardkurve führte das Programm die Berechnung der Cefalexinkonzentration in den Proben durch.

### 3.2.6.2 *Nachweis von CEFTIOFUR in künstlich kontaminierter Milch*

Zur Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit der entwickelten EIAs als Verfahren zum Nachweis von Ceftiofur-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Milch) wurden Milchproben mit Ceftiofur künstlich kontaminiert und in die kompetitiven indirekten EIAs, unter Verwendung des Antiserums von Kan. 5 (EIA-1(C)) bzw. Kan. 6 (EIA-2(CM)), eingesetzt.

#### 3.2.6.2.1 *Künstliche Kontaminierung und Probenvorbereitung*

Die künstliche Kontaminierung der Milchproben mit Ceftiofur und Probenvorbereitung erfolgte analog zu 3.2.6.1.1.

#### 3.2.6.2.2 *Durchführung der EIAs zum Nachweis von Ceftiofur*

Die künstlich kontaminierten Milchproben wurden in die EIAs (3.2.5.1) eingesetzt, als Negativkontrolle wurde stets eine antibiotikafreie Milchprobe mituntersucht. Die entsprechenden Ceftiofur-Standardkurven und Probenverdünnungen wurden in 10 % iger Magermilchpulverlösung angefertigt. Vorversuche hatten gezeigt, dass zur Vermeidung unspezifischer Matrixeffekte, ebenso wie im Testsystem für Cefalexin (3.2.6.1.2), die Milchproben entfettet und Verdünnungen in 10 % iger Magermilchpulverlösung angelegt werden müssen.

### 3.2.6.2.3 *Auswertung der EIAs zum Nachweis von Ceftiofur*

Die Auswertung erfolgte analog zu 3.2.6.1.3.

### 3.2.6.3 Nachweis von CEFTIOFUR in hemmstoffpositiver Anlieferungsmilch

Bei den drei hier beschriebenen mit Ceftiofur kontaminierten Milchproben handelte es sich um Anlieferungsproben des Jahres 2003 verschiedener Milchviehbetriebe (Bestandsgröße jeweils ca. 60 - 80 Rinder) in Hessen, die im Rahmen der Güteprüfung durch den HVL mittels BRT als hemmstoffpositiv ermittelt wurden. Die betroffenen Landwirte hatten jeweils Excenel<sup>®</sup> RTU bzw. Excenel<sup>®</sup> eingesetzt. Die Proben wurden an die Professur für Milchwissenschaften zur Abklärung, d.h. zur Identifizierung und Quantifizierung der Rückstands-verursachenden Substanz, übersandt.

#### 3.2.6.3.1 *Vorberichte zu den Milchproben*

##### Probe A005/2003

Im ersten Fall war vorberichtlich – nach Angaben des Tierhalters – eine Kuh des Betriebs acht Tage vor Probenahme einmal mit 10 ml Excenel<sup>®</sup> RTU (entsprechend 500 mg Ceftiofur/Tier, normale Dosierung) vom Landwirt selbst behandelt worden. Die Applikationsart konnte nicht genau geklärt werden, nach Angaben des Landwirts erfolgte sie intramuskulär. Zugelassen ist das Medikament für Rinder jedoch nur für die subcutane Applikation.

##### Probe A031/2003

Im zweiten Fall war eine Kuh des Betriebs zwölf oder fünf Tage vor Probenahme drei Tage lang mit Excenel<sup>®</sup> RTU (Dosierung unbekannt) vom Landwirt selbst behandelt worden. Die Applikationsart ist nicht bekannt, vermutlich erfolgte die Verabreichung intramuskulär.

##### Probe A037/2003

Im dritten Fall handelt es sich um eine Verdachtsprobe, die von der Molkerei gezogen worden war. Der Landwirt hatte Excenel<sup>®</sup> intramammär eingesetzt.

### 3.2.6.3.2 *Untersuchung mittels mikrobiologischer Tests, Rezeptor-Bindungstests und EIAs*

Zur Identifikation von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika als Hemmstoffursache wurden im Rahmen eines integrierten Nachweis- und Differenzierungssystems verschiedene Testsysteme eingesetzt. Der Einsatz der Milchproben in den als mikrobiologisches Testsystem verwendeten BRT erfolgte laut Herstellerangaben. Zusätzlich erfolgte eine Penicillinase-Behandlung der Proben: dazu wurde die jeweilige Milchprobe (1 ml) mit 20  $\mu$ l Penicillinase versetzt und bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln 30 min inkubiert. Die unbehandelten Milchproben sowie die Penicillinase-behandelten Milchproben wurden dann jeweils im Vierfachansatz unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungsstufen (z. B. 1:3, 1:9, 1:27) eingesetzt.

Zur weiteren Untersuchung der Gruppenidentität „ $\beta$ -Laktam-Antibiotika“ wurden zwei Rezeptor-Bindungstests (SNAP<sup>®</sup> Beta-laktam Test,  $\beta$ eta-s.t.a.r.), ebenfalls gemäß den jeweiligen Herstellerangaben, durchgeführt. Hier wurden wiederum die unbehandelten Milchproben sowie die Penicillinase-behandelten Milchproben jeweils unverdünnt eingesetzt.

Zum Ausschluss von Penicillinen als Rückstands-Verursacher wurden die Milchproben in einen gruppenspezifische EIA zum Nachweis von Penicillinen (USLEBER *et al.*, 1998) eingesetzt. Die unbehandelten Milchproben sowie die Penicillinase-behandelten Milchproben wurden jeweils im Vierfachansatz unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungsstufen (z. B. 1:3, 1:9, 1:27) eingesetzt.

### 3.2.6.3.3 *Untersuchung mittels EIAs zum Nachweis von Ceftiofur*

Die übersandten Milchproben wurden in Vierfachansätzen in die kompetitiven indirekten EIAs nach 3.2.5.1 eingesetzt, als Negativkontrolle wurde stets eine antibiotikafreie Milchprobe mituntersucht. Die entsprechenden Ceftiofur-Standardkurven und Probenverdünnungen wurden in 10 % iger Magermilchpulverlösung angesetzt. Zur Vermeidung unspezifischer Matrixeffekte wurden die Milchproben vor dem Einsatz in die Testsysteme entfettet. Die Auswertung mittels Computerprogramm erfolgte analog zu 3.2.6.1.3.

### 3.2.6.4 Nachweis von CEFTIOFUR in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation

Der Nachweis von Ceftiofur und Metaboliten mittels EIA nach therapeutischer Applikation des Präparates Excenel® RTU wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer, der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. K. Doll) überprüft. Hierzu wurden Milchproben einer Kuh (Alter: vier Jahre, Schwarz-Bunte-Holstein, zwei Kalbungen; aus einem Betrieb mit ca. 50 Milchrindern) gewonnen, die zur Behandlung einer Tarsalgelenksphlegmone nach Herstellerempfehlung mit 1 mg Ceftiofur/kg Körpergewicht (KGW) einmal täglich drei Tage lang subcutan behandelt worden war. Die Einzelgemelke wurden ab dem ersten Tag der Behandlung bis fünf Tage nach Behandlungsende gesammelt. Das Behandlungsprotokoll ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Untersuchung der Milchproben erfolgte wie in 3.2.6.3.3 beschrieben.

Tabelle 3.3: Behandlungsprotokoll der Applikation des Präparates Excenel® RTU

<b>Behandlungsprotokoll</b>		<b>Präparat Excenel® RTU</b>		
<b>Tag</b>	<b>Uhrzeit der Behandlung (Menge, Applikationsart)</b>	<b>Probennahme (Uhrzeit)</b>		<b>interne Proben- Nr.</b>
Tag 1	11.00 h (12 ml s.c.)	15.00 h	-	1
Tag 2	12.00 h (12 ml s.c.)	8.00 h	15.00 h	2, 3
Tag 3	10.00 h (12 ml s.c.)	8.00 h	15.00 h	4, 5
Tag 4	-	8.00 h	15.00 h	6, 7
Tag 5	-	8.00 h	15.00 h	8, 9
Tag 6	-	8.00 h	15.00 h	10, 11
Tag 7	-	8.00 h	15.00 h	12, 13
Tag 8	-	8.00 h	15.00 h	14

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Herstellung der Immunreagenzien**

#### **4.1.1 Herstellung der Protein-Konjugate**

Die photometrische Quantifizierung der Antibiotika-Enzym-Konjugate bei 403 nm ergab Konzentrationen von 3,0 mg/ml (Cefalexin-C-HRP) bzw. 2,5 mg/ml (Ceftiofur-C-HRP). Die ermittelten Proteingehalte der hergestellten Konjugate sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 dargestellt.

Die UV-Spektren der Konjugate wurden von der Absorption der Trägerproteine (BSA, KLH) im Bereich von 200 - 240 nm bestimmt. Die Absorption durch gebundenes Cefalexin bzw. Ceftiofur im Bereich um 260 nm bzw. 290 nm wurde dadurch stark überlagert. Insgesamt entsprachen die Differenzspektren (UV-Spektrum Antibiotikum-Protein-Konjugat minus UV-Spektrum Protein) mit ihren Maxima bei Wellenlängen von 262 nm (Cefalexin) bzw. 293 nm (Ceftiofur) dem Spektrum des reinen Antibiotikums (Abbildungen 4.1, 4.2 und 4.3).

Eine Abschätzung der Menge des gebundenen Antibiotikums ergab typische Kopplungsraten von 0,5 - 2 Mol Antibiotikum zu 1 Mol HRP, bzw. 3 - 10 Mol Ceftiofur pro Mol BSA.

Tabelle 4.1: Gehalt der Antibiotika-Enzymkonjugate an HRP

<b>Kopplungsprodukt (Kopplungsmethode bzw. -reagenz)</b>	<b>Gehalt an HRP in mg/ml</b>
Cefalexin-HRP (Carbodiimid)	3,0
CeftiofurNa-HRP (Carbodiimid)	2,5

Tabelle 4.2: Gehalt der Immunogene und Festphasenantigene an KLH bzw. BSA

<b>Kopplungsprodukt (Kopplungsmethode bzw. -reagenz)</b>	<b>Proteingehalt in mg/ml</b>
Cefalexin-KLH (Glutardialdehyd)	4,4
Ceftiofur-KLH (Glutardialdehyd)	4,4
CeftiofurNa-BSA (Glutardialdehyd)	6,5
CeftiofurNa-BSA (Carbodiimid)	5,6
CeftiofurHCl-BSA (Carbodiimid)	3,3

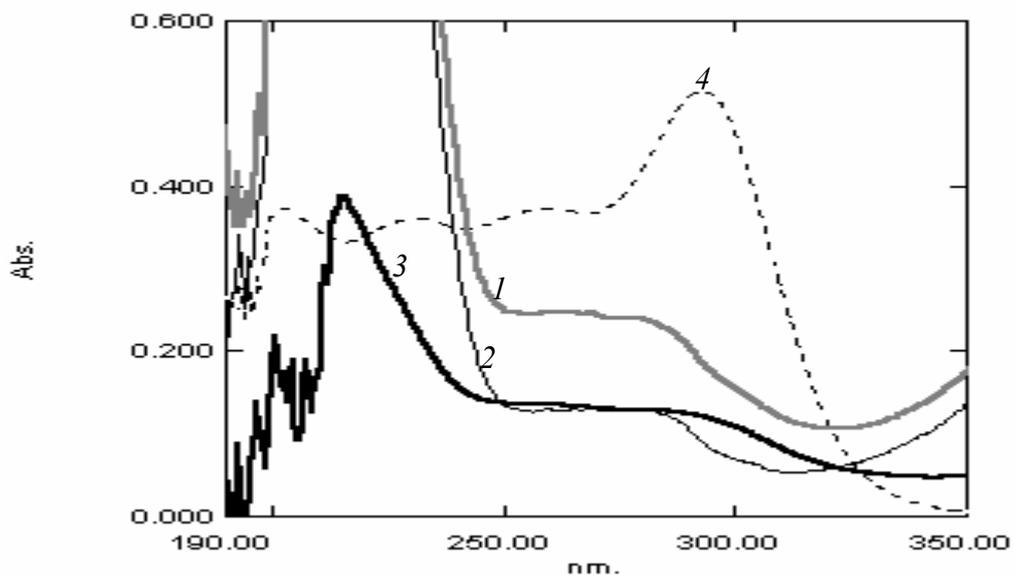
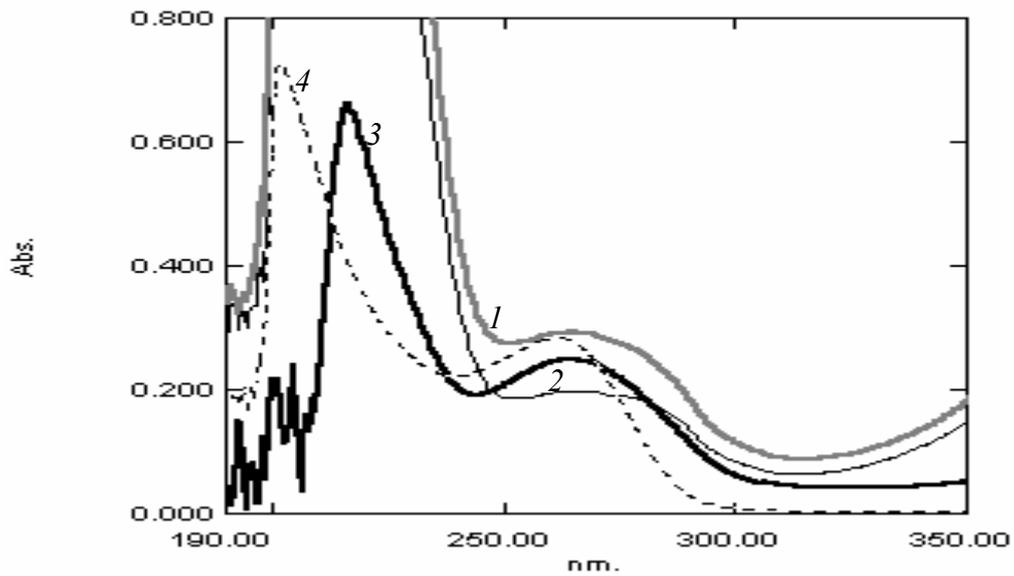


Abbildung 4.1: UV-Spektren der mit Cefalexin (oben) bzw. Ceftiofur (unten) mittels Carbodiimid synthetisierten Antibiotikum-HRP-Konjugate. Zum Vergleich ist jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat (1) und reinem Enzym (2) ermittelte Differenzspektrum (3) sowie das reine Antibiotikum-Spektrum (4) eingezeichnet

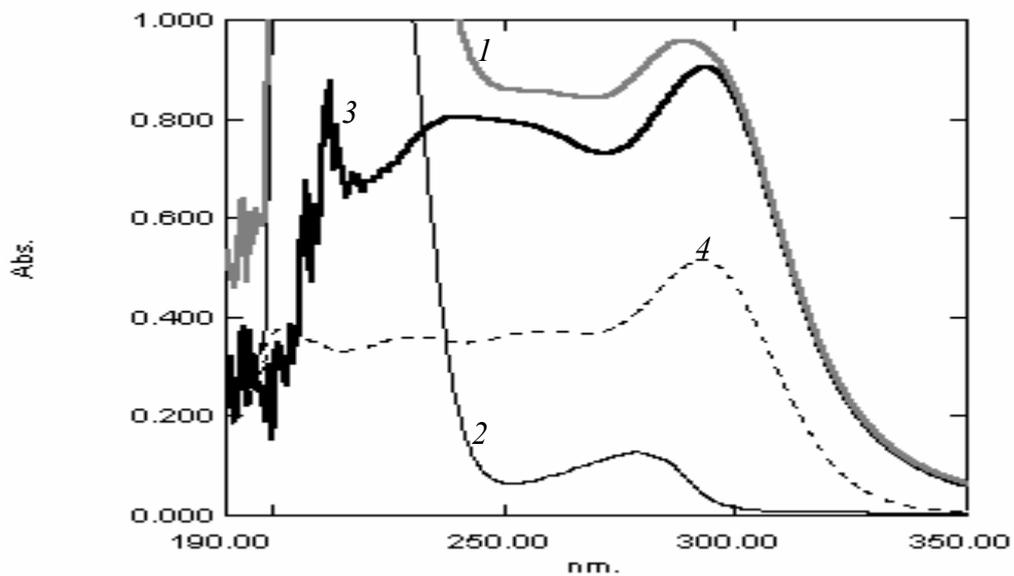
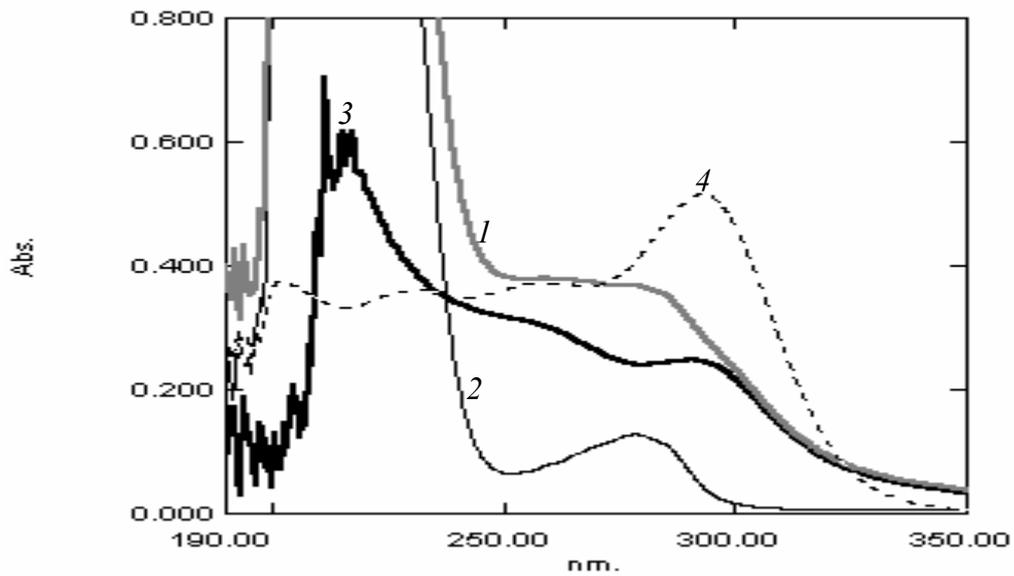


Abbildung 4.2: UV-Spektren der mit CeftiofurNa (oben) bzw. CeftiofurHCl (unten) und BSA mittels Carbodiimid synthetisierten Protein-Konjugate. Zum Vergleich ist jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat (1) und reinem Protein (2) ermittelte Differenzspektrum (3) sowie das reine Antibiotikum-Spektrum (4) eingezeichnet

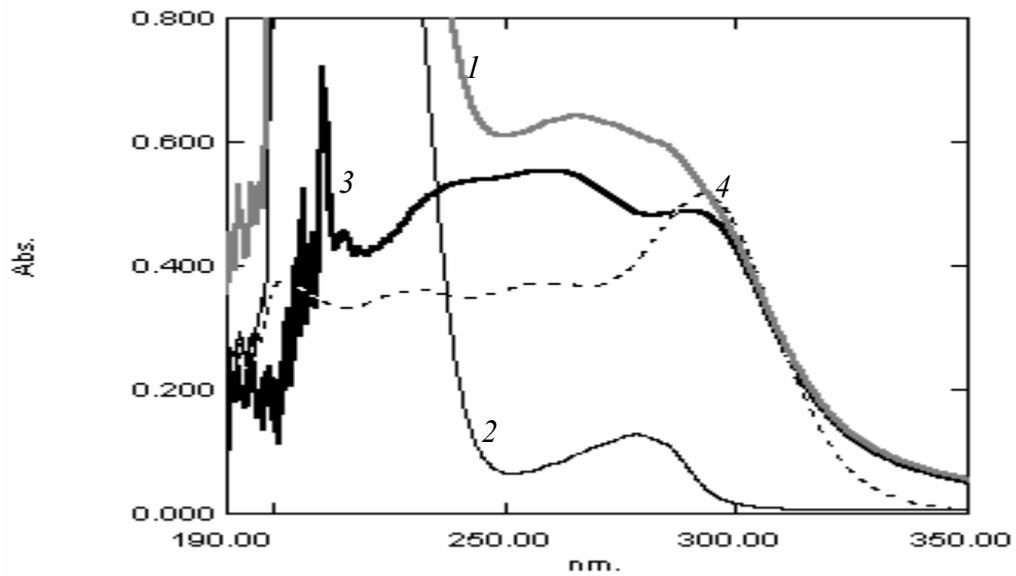


Abbildung 4.3: UV-Spektrum des mit CefotiofurNa und BSA mittels Glutaraldehyd synthetisierten Protein-Konjugates. Zum Vergleich ist jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat (1) und reinem Protein (2) ermittelte Differenzspektrum (3) sowie das reine Antibiotikum-Spektrum (4) eingezeichnet

## **4.1.2 Gewinnung spezifischer Antiseren**

### **4.1.2.1 Immunisierungsverlauf**

Mit den hergestellten Immunogenen konnte in allen Kaninchen eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden. Allerdings zeigten die entwickelten Antikörpertiter individuelle Unterschiede bezüglich Verlauf und Höhe. Der Immunisierungsverlauf zwischen der Cefalexin-Kaninchen-Gruppe und der Ceftiofur-Kaninchen-Gruppe wies deutliche Unterschiede auf (Abbildungen 4.4 und 4.5).

Die Seren der Kan. 1 - 4 (Cefalexin-KLH) zeigten bereits vier Wochen nach der Grundimmunisierung einen steilen Titeranstieg. Kan. 3 und Kan. 4 wiesen dabei den insgesamt höchsten Antikörpertiter auf. Eine in der 17. Woche bei allen vier Kaninchen durchgeführte Restimulierung konnte den Serumtiter weiter erhöhen, dann fiel der Titer kontinuierlich über Wochen langsam wieder ab.

Die Seren der Kan. 5 - 8 (Ceftiofur-KLH) wiesen vier Wochen nach der Grundimmunisierung einen in Vergleich dazu geringeren Titeranstieg auf, der kurz stagnierte und dann schnell wieder abfiel. Kan. 5 und Kan. 6 wiesen dabei den höchsten Antikörpertiter auf. Seine höchsten Werte erreichte der Titer nach der ersten Restimulierung (in der 12. Woche) und nach zwei weiteren Restimulierungen (in der 16. und 32. Woche). Die Restimulierungen führten meist jeweils nur zu einem kurzzeitigen Anstieg des Titers, weshalb die Intervalle der Blutentnahmen bei den Kan. 5 - 8 in dieser Zeit auf eine Woche verkürzt wurden.

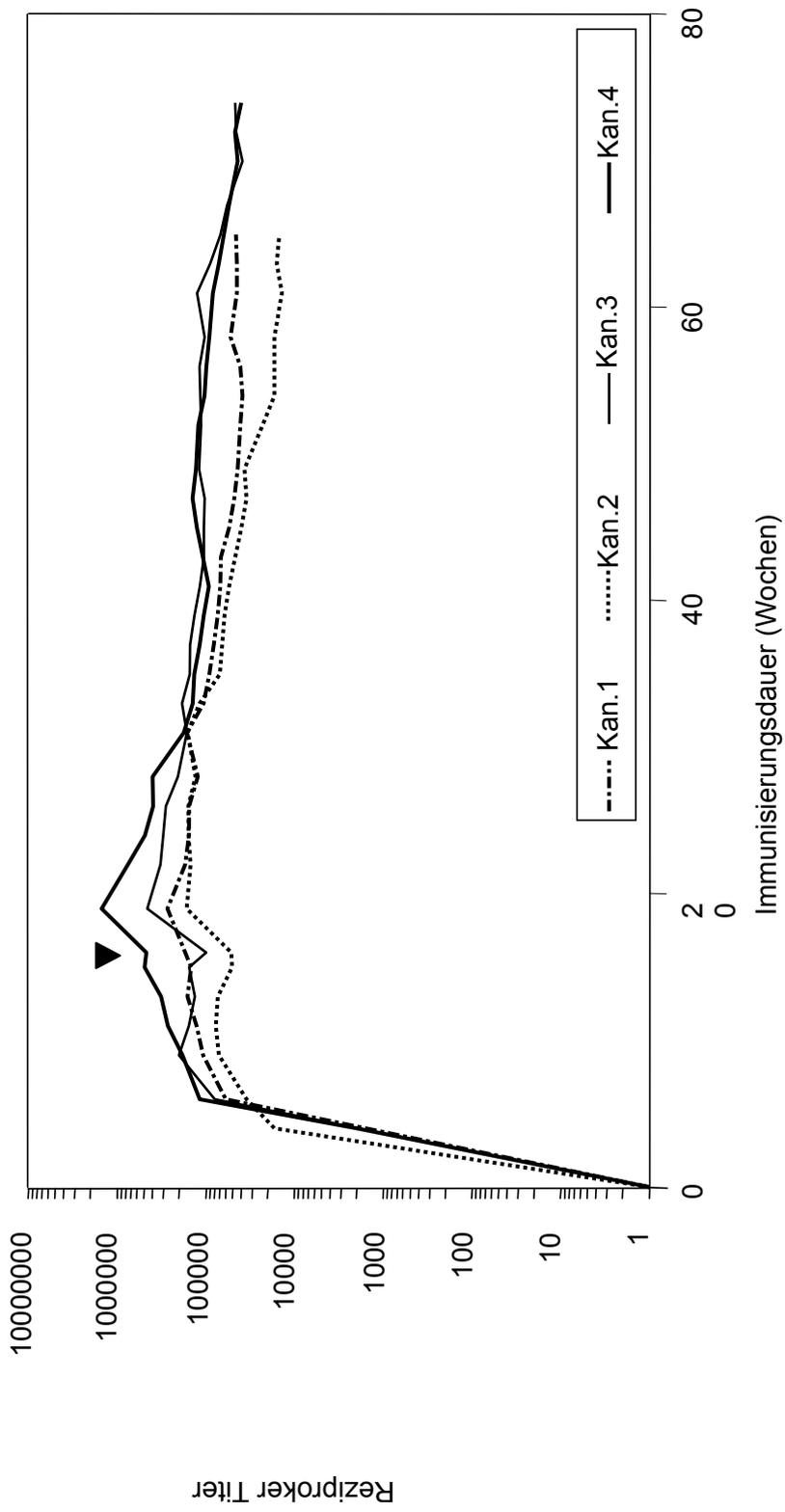


Abbildung 4.4: Serumtiter der mit Cefalexin-KLH immunisierten Kan. 1, 2, 3 und 4. Der Zeitpunkt der Restimulierung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet

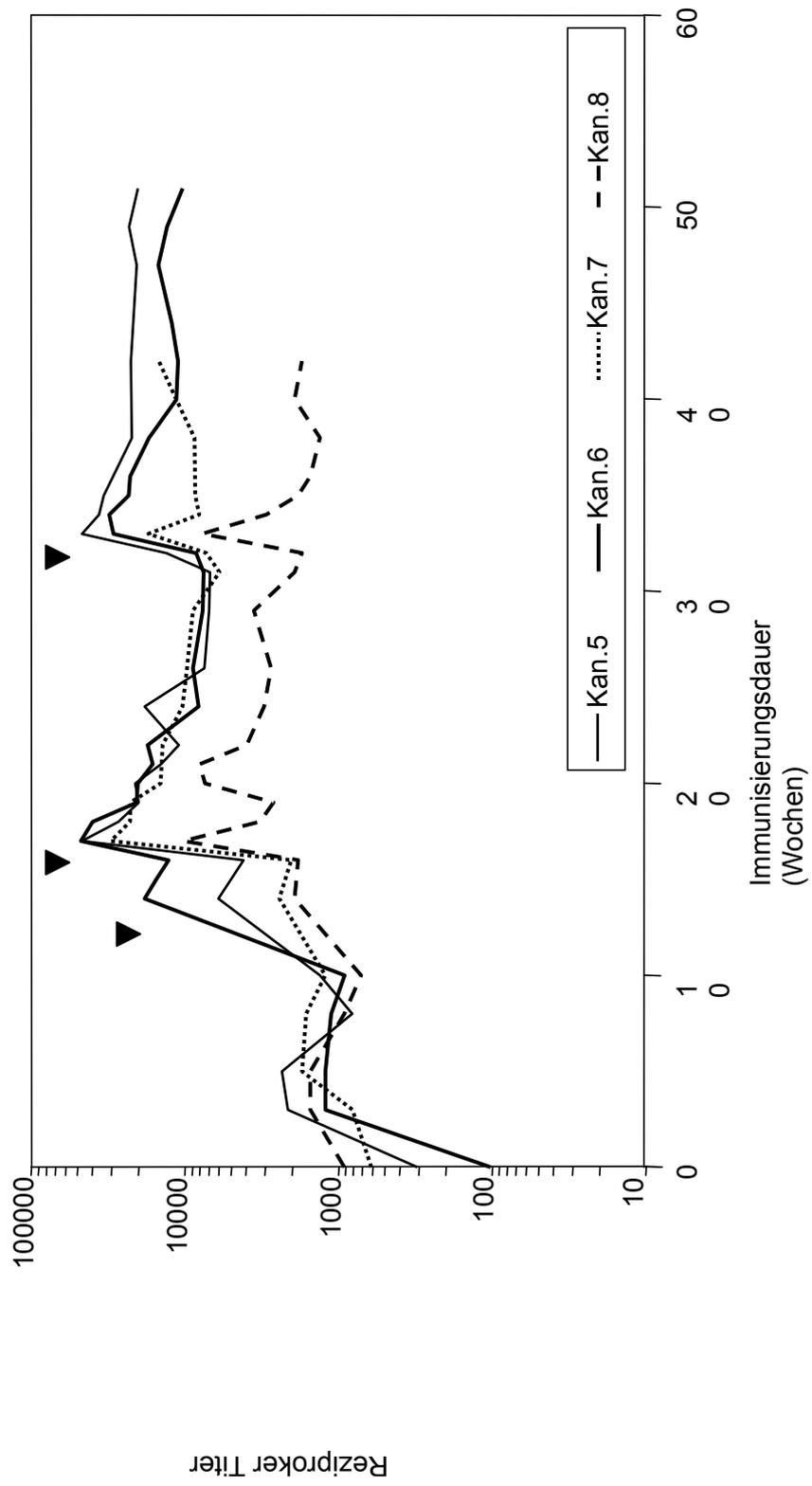


Abbildung 4.5: Serumtiter der mit Ceftiofur-KLH immunisierten Kan. 5, 6, 7 und 8. Der Zeitpunkt der Restimulierungen ist mit Pfeilen gekennzeichnet

#### 4.1.2.2 Auswahl der am besten geeigneten Antiseren

Nach den in 3.2.1.2.4 aufgeführten Kriterien ergaben sich bei den mit Cefalexin-KLH immunisierten Tieren die größten Extinktionsunterschiede, bei relativ hohen Serumtitern, für die Seren von Kan. 3 und Kan. 4. Bei beiden Tieren wurden jeweils die Seren aus der 9. bis 54. Woche für die Erstellung eines Antiserumpools ausgewählt.

Bei den mit Ceftiofur-KLH immunisierten Tieren wiesen die Seren von Kan. 5 und Kan. 6 die größten Extinktionsunterschiede, bei ausreichend hohem Titer, auf. Da es nach der Restimulierung nur zu einem kurzzeitigen Titeranstieg kam, wurden jeweils nur wenige Serumabnahmen für die Erstellung eines Antiserumpools verwendet. Bei Kan. 5 wurde für die Erstellung des Antiserumpools die Seren aus der 14., 17., 18., 19., 33., 34. und 35. Immunisierungswoche, und bei Kan. 6 die Seren aus der 17., 18., 33. und 34. Immunisierungswoche ausgewählt.

## 4.2 Herstellung der Ceftiofur-Derivate und Hydrolyse von Ceftiofur bzw. Cefalexin

Bei der Überprüfung der mikrobiologischen Aktivität des Derivatisierungsansatzes von Ceftiofur zu DFC wurde im BRT eine ca. 9 – 27mal schwächere Aktivität von DFC im Vergleich zur Muttersubstanz Ceftiofur festgestellt. Für den Derivatisierungsansatz von Ceftiofur zu DFA zeigte sich ein ähnliches Resultat. Die absoluten Nachweisgrenzen für Ceftiofur bzw. DFC lagen im BRT-Hemmstofftest bei durchschnittlich 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml. Diese Ergebnisse deuten auf die Entstehung von Metaboliten hin, aufgrund des chemischen Reaktionsmechanismus kann davon ausgegangen werden, dass zum größten Teil der Hauptmetabolit DFC entstanden ist. Die Reaktivität entsprach insgesamt den Literaturangaben.

Nach alkalischer Hydrolyse von Ceftiofur bzw. Cefalexin (jeweils  $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) war erwartungsgemäß im BRT keine mikrobiologische Aktivität mehr nachweisbar.

### **4.3 Enzymimmuntests**

#### **4.3.1 EIAs zum Nachweis von CEFALEXIN**

##### **4.3.1.1 Kompetitiver direkter simultaner EIA zum Nachweis von Cefalexin**

###### **4.3.1.1.1 Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems**

Die Bestimmung der optimalen Kombination von Enzymkonjugat und gefälltem Antiserum ergab, dass die höchste Testempfindlichkeit mit einer Verdünnung von 1:4000 der Antiserumpools von Kan. 3 bzw. Kan. 4 erzielt wurde, bei einer Verdünnung des Cefalexin-Enzymkonjugates von 1:20000 (Kan. 3) bzw. 1:40000 (Kan. 4) (Tabelle 4.3).

Mit diesen Kombinationen wurden Standardkurven in 10 % iger Magermilchpulverlösung erstellt. In Tabelle 4.4 sind die verschiedenen Testparameter (50 %-Dosis, Nachweisgrenze, Messbereich der Standardkurven) zusammengestellt. Die mit verschiedenen Antiseren erstellten Standardkurven für Cefalexin in 10 % iger Magermilchpulverlösung zeigen in ihrem Messbereich und in der Nachweisempfindlichkeit der Testsysteme Unterschiede. Während der Test unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 3 einen Konzentrationsbereich von 0,026 - 200 ng/ml erfasste und dabei eine durchschnittliche 50 %-Dosis von 2,1 ng/ml sowie eine mittlere Nachweisgrenze von 0,8 ng/ml ermittelt wurde, wies der EIA unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 4 einen Messbereich von 0,008 - 60 ng/ml auf, bei einer durchschnittlichen 50 %-Dosis von 0,6 ng/ml sowie einer mittleren Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml. Die Bindung des Cefalexin-HRP-Konjugates konnte in beiden EIAs durch die höchsten verwendeten Cefalexinkonzentrationen jeweils bis nahe 0 % der Extinktion des cefalexinfreien Ansatzes gehemmt werden (Abbildung 4.6).

Tabelle 4.3: Optimierte Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnungen bzw. Konzentrationen in den kompetitiven direkten simultanen EIAs zum Nachweis von Cefalexin (direkte Beschichtung mit Antiserum)

Serum des Kaninchens	gefälltes Antiserum (in Bicarbonatpuffer)		Enzymkonjugat (in 1 % Casein/PBS)	
	Immunogen (Kopplungsmethode)	Verdünnung des Serums	Bezeichnung	Verdünnung des Konjugates HRP Konzentration (in ng/ml)
3	Cefalexin-KLH (GA)	1:4000	Cefalexin-HRP	1:20000 150
4	Cefalexin-KLH (GA)	1:4000	Cefalexin-HRP	1:40000 75

Legende:

- GA = Glutardialdehyd;
- HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase;
- KLH = keyhole limpet hemocyanin;
- PBS = phosphate buffered saline, Phosphatpuffer (vgl. 3.1.3)

Tabelle 4.4: Testempfindlichkeit der kompetitiven direkten simultanen EIAs zum Nachweis von Cefalexin (direkte Beschichtung mit Antiserum)

Kaninchen	Antiserum	Enzymkonjugat	Standardkurve (ng/ml)	50 %-Dosis * (ng/ml)	NWG ** (70 % -Extinktionswert) (ng/ml)	Anzahl der ausgewerteten Standardkurven
	Immunogen (Kopplungs- Methode)					n
3	Cefalexin-KLH (GA)	Cefalexin-HRP	0,026 - 200	2,1	0,8	70
4	Cefalexin-KLH (GA)	Cefalexin-HRP	0,008 - 60	0,6	0,2	69

Legende:

GA = Glutaraldehyd;

HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase;

KLH = keyhole limpet hemocyanin;

\*) 50 % Dosis = diejenige Cefalexin-Konzentration, welche einen Extinktionswert von 50 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab;

\*\*) NWG = Nachweisgrenze bestimmt als diejenige Cefalexin-Konzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Antibiotikums um 30 % reduzierte und damit einen Extinktionswert von 70 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab

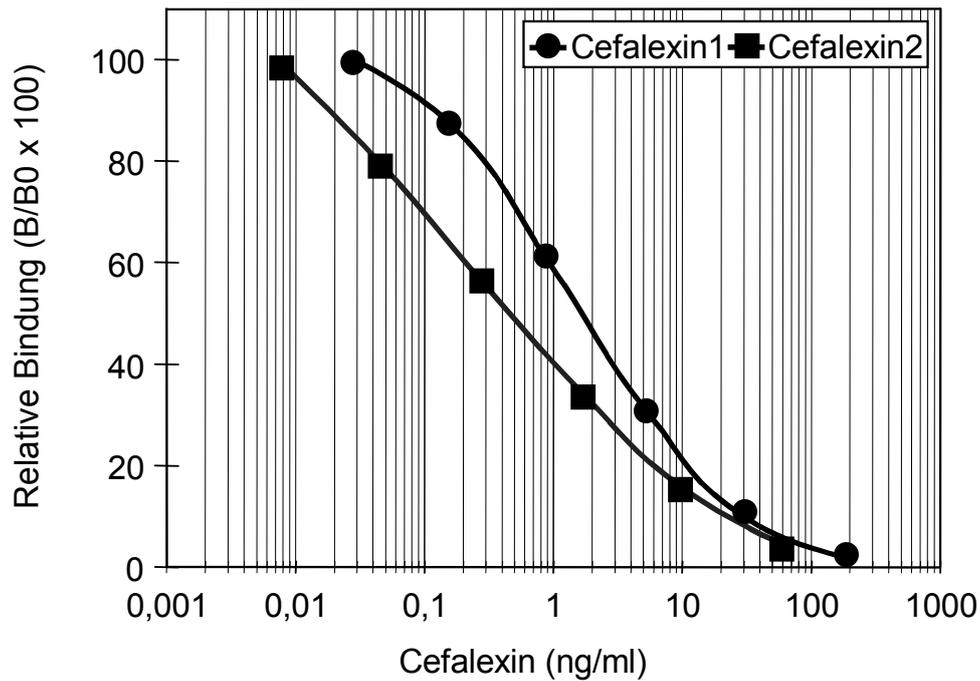


Abbildung 4.6: Standardkurvenvergleich der EIAs zum Nachweis von Cefalexin:  
 Cefalexin 1: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 3  
 Cefalexin 2: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 4

#### 4.3.1.1.2 Spezifität des Testsystems

Beide Testsysteme wiesen eine hohe und sehr ähnliche Spezifität auf. Die meisten der getesteten Cephalosporine, alle getesteten Penicilline sowie die durch alkalische Hydrolyse bzw. enzymatische Spaltung erzeugten Derivate zeigten selbst in den höchsten verwendeten Konzentrationen keine kompetitive Hemmung. Nur die dem Cefalexin strukturell sehr ähnlichen, in der Veterinärmedizin nicht zugelassenen Cephalosporine Cefaclor, Cefadroxil und Cephradine zeigten eine messbare relative Kreuzreaktion (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Relative Kreuzreaktion der Antiseren von Kan. 3 bzw. Kan. 4 gegen Cefalexin mit anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika

<b><math>\beta</math>-Laktam-Antibiotikum</b>	<b>relative Kreuzreaktion (%) mit Antiserum</b>	
	<b>Kaninchen 3</b>	<b>Kaninchen 4</b>
<b>Bezeichnung</b>		
Cefapirin	-	-
Cefoperazon	-	-
Cefazolin	-	-
Ceftiofur	-	-
Cefaclor	31	53
Cefmandol	< 0,1	< 0,2
Cefadroxil	55	22
Ceftriaxon	-	-
Cefoxitin	-	-
Cephhradn	82	73
Cefmetazol	-	-
Cefotaxim	-	-
Cefsulodin	-	-
Cefuroxim	-	-
Cefquinom	-	-
Cefalonium	-	-
Cefacetril	< 0,03	< 0,01
Penicillin G	-	-
Ampicillin	-	-
Amoxicillin	-	-
Cloxacillin	-	-
Dicloxacillin	-	-
Oxacillin	-	-
DFC	-	-
DFA	-	-
BPO	-	-
Penicillin G + P	-	-
Cefalexin + P	-	-
Ceftiofur + P	-	-
DFC + P	-	-
DFA + P	-	-

Legende:

- DFC = Desfuroylceftiofur;
- DFA = Desfuroylceftiofur-Acetamid;
- BPO = durch alkalische Hydrolyse erzeugte Penicillin G Derivate (siehe 3.1.2);
- + P = enzymatische Hydrolyse durch Penicillinase-Behandlung (siehe 3.1.2);
- = keine Hemmung durch 0,1 mg/ml der betreffenden Substanz

#### 4.3.1.2 Kompetitiver direkter simultaner EIA zum Nachweis von Cefalexin (DASP)

##### 4.3.1.2.1 *Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems*

Die nach den in 3.2.1.2.4 erläuterten Kriterien ermittelten optimalen Kombinationen von Antiserum und Enzymkonjugat sowie deren Verdünnungen zur Durchführung der direkten simultanen EIAs auf Basis der Doppelantikörpertechnik sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Die in diesem Testaufbau erstellten Standardkurven für Cefalexin in 10 % iger Magermilchpulverlösung zeigen geringe Unterschiede hinsichtlich des Messbereiches der Kurven und Empfindlichkeit der Testsysteme (Tabelle 4.7). Während der Test unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 3 einen Konzentrationsbereich von 0,195 - 200 ng/ml erfasste und dabei eine durchschnittliche 50 %-Dosis von 3,3 ng/ml sowie eine mittlere Nachweisgrenze von 1,5 ng/ml ermittelt wurde, wies der EIA unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 4 einen Messbereich von 0,098 - 100 ng/ml auf, bei einer durchschnittlichen 50 %-Dosis von 0,5 ng/ml und einer mittleren Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml. Die Bindung des Cefalexin-HRP-Konjugates konnte in beiden EIAs durch die höchsten verwendeten Cefalexinkonzentrationen jeweils bis nahe 0 % der Extinktion des cefalexinfreien Ansatzes gehemmt werden (Abbildung 4.7).

Tabelle 4.6: Optimierte Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnungen bzw. Konzentrationen in den kompetitiven direkten simultanen EIAs zum Nachweis von Cefalexin (DASP)

Serum des Kaninchens	gefälltes Antiserum (in PBS)		Enzymkonjugat (in 1 % Casein/PBS)		
	Immunogen (Kopplungsmethode)	Verdünnung des Serums	Bezeichnung	Verdünnung des Konjugates	
				HRP Konzentration (in ng/ml)	
3	Cefalexin-KLH (GA)	1:9000	Cefalexin-HRP	1:9000	333
4	Cefalexin-KLH (GA)	1:10000	Cefalexin-HRP	1:30000	100

Legende:

- GA = Glutardialdehyd;
- HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase;
- KLH = keyhole limpet hemocyanin;
- PBS = phosphate buffered saline, Phosphatpuffer (vgl. 3.1.3)

Tabelle 4.7: Testempfindlichkeit der kompetitiven direkten simultanen EIAs zum Nachweis von Cefalexin (DASP)

Kaninchen	Antiserum Immuno- (Kopplungs- methode)	Enzymkonjugat	Standardkurve (ng/ml)	50 %-Dosis * (ng/ml)	NWG ** (70 % -Ex- tinktionswert) (ng/ml)	Anzahl der ausgewerteten Standardkurven n
3	Cefalexin-KLH (GA)	Cefalexin-HRP	0,195 - 200	3,3	1,5	2
4	Cefalexin-KLH (GA)	Cefalexin-HRP	0,098 - 100	0,5	0,1	2

Legende:

GA = Glutardialdehyd;

HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase;

KLH = keyhole limpet hemocyanin;

\*) 50 % Dosis = diejenige Cefalexin-Konzentration, welche einen Extinktionswert von 50 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab;

\*\* ) NWG = Nachweisgrenze bestimmt als diejenige Cefalexin-Konzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Antibiotikums um 30 % reduzierte und damit einen Extinktionswert von 70 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab

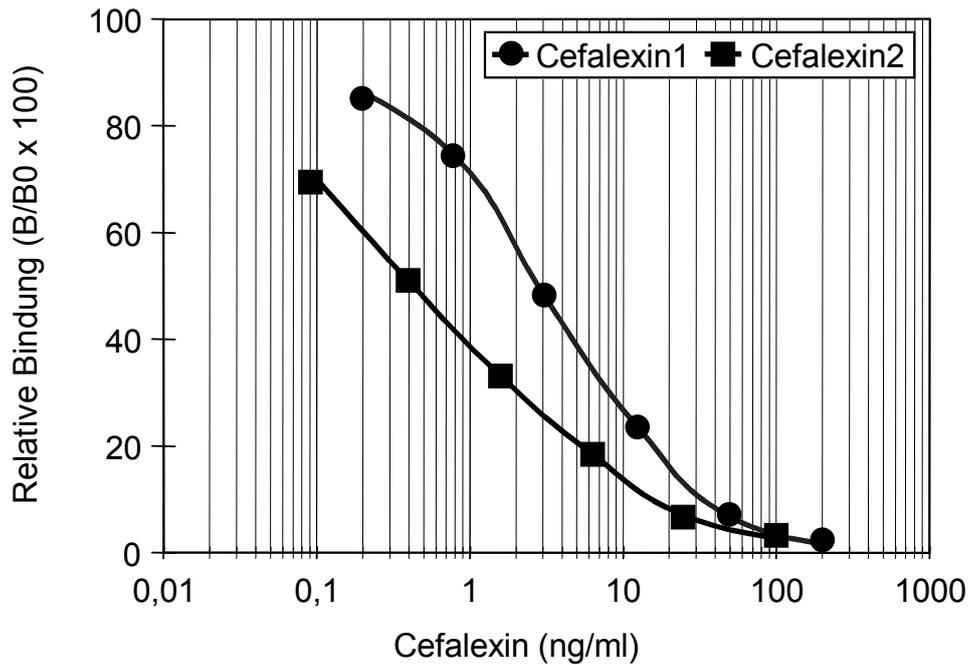


Abbildung 4.7: Standardkurvenvergleich der EIAs zum Nachweis von Cefalexin (DASP): Cefalexin 1: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 3  
 Cefalexin 2: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 4

#### 4.3.1.2.2 Spezifität des Testsystems

Die beiden Nachweissysteme unterscheiden sich kaum in ihrer Spezifität, wie der Vergleich der relativen Kreuzreaktion mit anderen Cephalosporinen und Penicillinen zeigte. Bei orientierenden Untersuchungen zur Kreuzreaktivität erwiesen sich die Antiseren sowohl von Kan. 3 als auch von Kan. 4 als hochspezifisch für Cefalexin und zeigten lediglich eine relative Kreuzreaktion mit dem strukturell sehr ähnlichen Cephalosporin Cefaclor. Das Antiserum von Kan. 3 zeigt hier eine relative Kreuzreaktion von 25 % und das Antiserum von Kan. 4 zeigt eine relative Kreuzreaktion von 60 %.

#### 4.3.1.3 Vergleich der kompetitiven direkten simultanen EIAs zum Nachweis von Cefalexin in verschiedenen Testaufbauten

Wie aus dem Vergleich der Tabellen 4.3 und 4.6 ersichtlich wird, mussten beim simultanen EIA mit direkter Beschichtung die Antiseren bis ca. um den Faktor 2 (Kan. 3) bzw. 2,5 (Kan. 4) höher konzentriert eingesetzt werden als bei der DASP-Technik. Dagegen konnte das bei der DASP-Technik eingesetzte Enzymkonjugat unter Verwendung der Antiserumpools in den Testsystemen mit direkter Beschichtung (bei beiden Kaninchen) in einer ca. um den Faktor 2 geringeren Konzentration eingesetzt werden. In beiden Testsystemen konnte die Bindung des Cefalexin-HRP-Konjugates durch die höchsten verwendeten Cefalexinkonzentrationen bis nahe 0 % der Extinktion des jeweiligen cefalexinfreien Ansatzes gehemmt werden.

Wie aus dem Vergleich der Tabellen 4.4 und 4.7 zu entnehmen ist, erfasste der EIA unter Verwendung der DASP-Technik ungefähr den gleichen Messbereich der Standardkurven wie das Testsysteme mit direkter Beschichtung. Zudem erwies sich die DASP-Technik hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit (50 %-Dosis) bei Kan. 3 ca. um den Faktor 1,5 schlechter als der EIA mit direkter Beschichtung.

### **4.3.2 EIAs zum Nachweis von CEFTIOFUR**

#### 4.3.2.1 Kompetitiver indirekter EIA zum Nachweis von Cefotiofur

##### 4.3.2.1.1 *Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems*

Für die Durchführung der indirekten EIAs wurde zuerst die optimale Konzentration des Festphasenantigens ermittelt. Als optimal erwies sich hier die Beschichtung mit Cefotiofur-(Natriumsalz)-C-BSA-Konjugat in einer Konzentration von 3 µg/ml. Die Bestimmung der optimalen Kombinationen von Antiserum und Enzymkonjugat sowie deren Verdünnungen zeigte, dass die höchste Testsensitivität mit Verdünnungen von jeweils 1:1000 (Antiserumpool von Kan. 5 bzw. Antiserumpool von Kan. 6) und jeweils 1:400 für das Enzymkonjugat erreicht wurde (Tabelle 4.8).

Die mit diesen Kombinationen in den angegebenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen erstellten Standardkurven für Cefotiofur in 10 % iger Magermilchlösung zeigen in ihrem Messbereich und in der Nachweisempfindlichkeit für Cefotiofur folgende Unterschiede: Während das Testsystem unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 5 (EIA-1(C)) einen Konzentrationsbereich von 0,247 - 60 ng/ml erfasste und dabei eine durchschnittliche 50 %-Dosis von 5,4 ng/ml sowie eine mittlere Nachweisgrenze von 1,9 ng/ml ermittelt wurde, wies der EIA unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 6 (EIA-2(CM)) einen Messbereich von 0,823 - 200 ng/ml auf, bei einer durchschnittlichen 50 %-Dosis von 12,6 ng/ml sowie einer mittleren Nachweisgrenze für Cefotiofur von 3,3 ng/ml. Die Bindung des Antiserums an das Festphasenantigen konnte in beiden Testsystemen durch die höchsten verwendeten Cefotiofurkonzentrationen bis jeweils nahe 0 % der Extinktion des cefotiofurfreien Ansatzes gehemmt werden (Abbildung 4.8). In Tabelle 4.9 sind verschiedene Parameter für die Empfindlichkeit der Testsysteme zusammengestellt.

Tabelle 4.8: Optimierte Antiserum- und Enzymkonjugatverdünnungen bzw. Konzentrationen in den kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Ceftiofur (Beschichtung mit Festphasenantigen)

Serum des Kaninchens	Festphasenantigen		Antiserum		Antikörper-Enzymkonjugat		
	Bezeichnung (in Bicarbonatpuffer)	Konzentration (in µg/ml)	Immunogen (Kopplungsmethode)	Verdünnung des Serums	Bezeichnung	Verdünnung des Konjugates	HRP Konzentration (in ng/ml)
5	CeftiofurNa-BSA (C)	3	Ceftiofur-KLH (GA)	1:1000	Anti-Kan.-IgG-HRP	1:400	3250
6	CeftiofurNa-BSA (C)	3	Ceftiofur-KLH (GA)	1:1000	Anti-Kan.-IgG-HRP	1:400	3250

Legende:

Anti-Kan.-IgG-HRP = affinitätschromatographisch gereinigtes Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-Serum, HRP markiert;

C = Carbodiimid;

GA = Glutardialdehyd;

HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase;

IgG = ImmunglobulinG;

Kan. = Kaninchen;

KLH = keyhole limpet hemocyanin;

PBS = phosphate buffered saline, Phosphatpuffer (vgl. 3.1.3)

Tabelle 4.9: Testempfindlichkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Ceftriaxon (Beschichtung mit Festphasenantigen)

Kaninchen	Antiserum		Beschichtung Festphasenantigen (Kopplungsmethode)	Standardkurve Konzentrations- bereich (ng/ml)	50 %-Dosis * (ng/ml)	NWG ** (70 % -Ex- tinktionswert) (ng/ml)	Anzahl der ausgewerteten Standardkurven n
	Immungen (Kopplungs- methode)						
5	Ceftriaxon-KLH (GA)		Ceftriaxon-BSA (C)	0,247 - 60	5,4	1,9	42
6	Ceftriaxon-KLH (GA)		Ceftriaxon-BSA (C)	0,823 - 200	12,6	3,3	42

Legende:

BSA = bovines Serumalbumin;

C = Carbodiimid;

GA = Glutaraldehyd;

KLH = keyhole limpet hemocyanin;

\*) 50 % Dosis = diejenige Ceftriaxon-Konzentration, welche einen Extinktionswert von 50 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab;

\*\*) NWG = Nachweisgrenze bestimmt als diejenige Ceftriaxon-Konzentration, welche die Bindung des immobilisierten Antigens um 30 % reduzierte und damit einen Extinktionswert von 70 % des Nullwertes (maximale Bindung) ergab

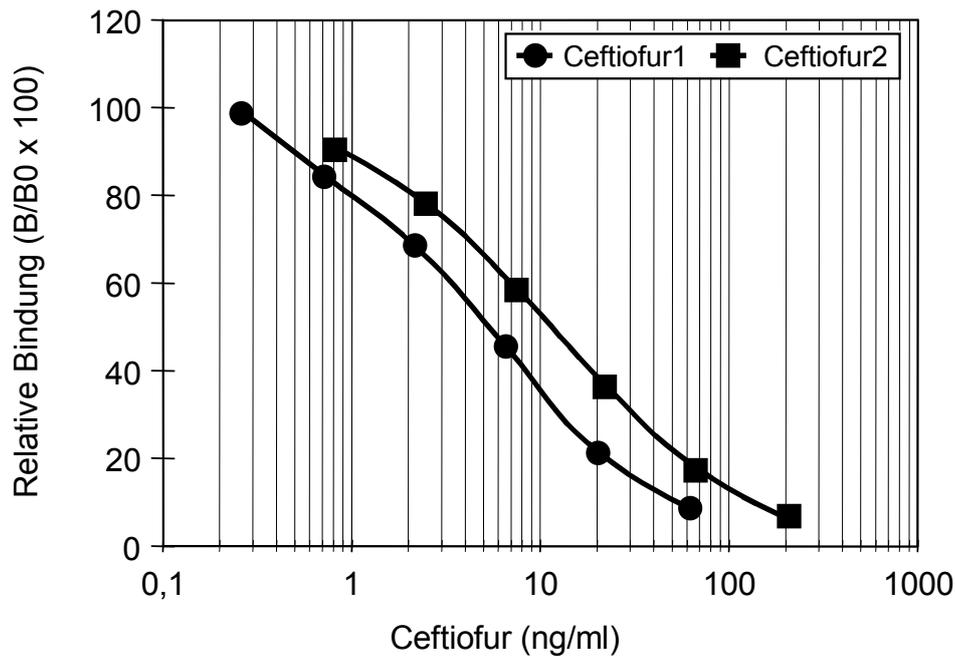


Abbildung 4.8: Standardkurvenvergleich der EIAs zum Nachweis von Ceftiofur:  
 Ceftiofur 1: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 5  
 Ceftiofur 2: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 6

#### 4.3.2.1.2 Spezifität des Testsystems

Der Antiserumpool von Kan. 5 wies keine messbaren Kreuzreaktionen mit den getesteten Cephalosporinen und Penicillinen sowie den durch alkalische Hydrolyse bzw. enzymatische Spaltung erzeugten Derivaten (Tabelle 4.10) auf. Auch die strukturverwandten Derivate (3.2.3) DFC und DFA führten in den höchsten verwendeten Konzentrationen zu keiner kompetitiven Hemmung im Testsystem. Für den Antiserumpool von Kan. 6 wurden die gleichen Substanzen getestet, hier zeigte sich eine relative Kreuzreaktion mit den in der Veterinärmedizin nicht zugelassen Cephalosporinen Ceftriaxon (29 %), Cefotaxim (10 %) und Cefuroxim (20 %). Besonders hervorzuheben ist jedoch die Kreuzreaktivität dieses Antiserumpools mit den Ceftiofur-Derivaten DFC und DFA (Tabelle 4.10). Die erstellten Standardkurven für DFC in 10 % iger Magermilchpulverlösung unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 6 ergab eine mittlere Nachweisgrenze von 100 ng/ml bei einer durchschnittlichen 50 %-Dosis von ca. 300 ng/ml (Abbildung 4.9).

Während sich also der Antiserumpool von Kan. 5 als hochspezifisch für die Muttersubstanz Cefotiofur erwies, ergab sich für das Antiserum von Kan. 6 eine relative Kreuzreaktion mit Cefotiofur-Metaboliten von ca. 5 %. Somit kann durch Kombination der beiden Testsysteme eine Differenzierung des Gehaltes von Proben bezüglich der Anwesenheit von Cefotiofur-Muttersubstanz und Metaboliten vorgenommen werden. Bei Feststellung der Abwesenheit von Cefotiofur mit dem ersten Testsystem lassen positive Ergebnisse im zweiten Testsystem auf die Anwesenheit von DFC(metaboliten) schließen, und zwar aufgrund der relativen Kreuzreaktion von ca. 5 % in ca. 20fach höherer Konzentration als nach Cefotiofur-Standards berechnet.

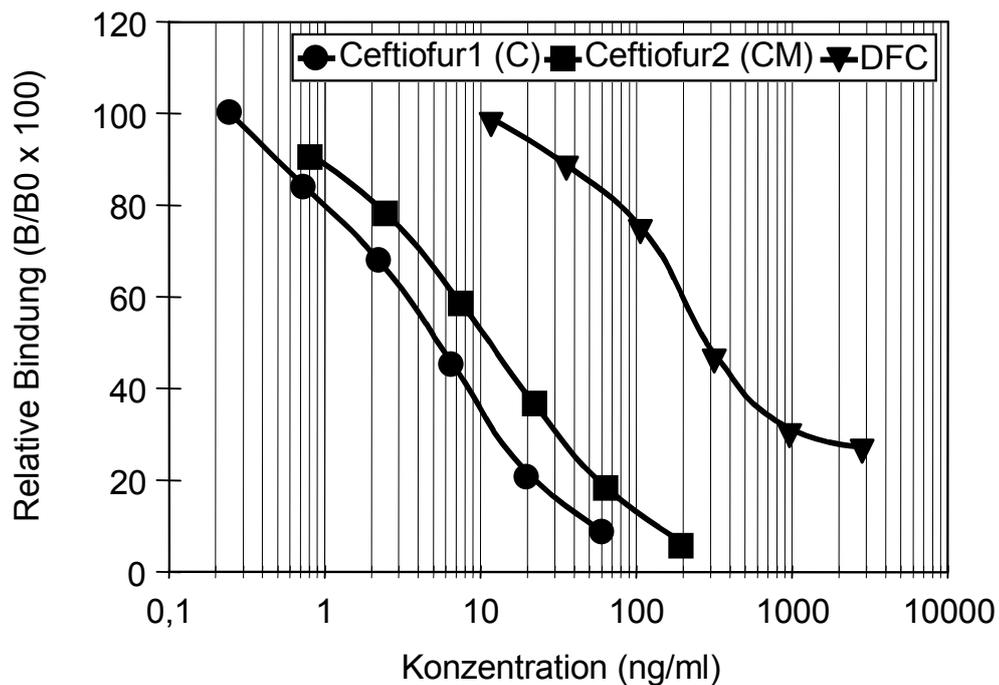


Abbildung 4.9: Standardkurvenvergleich der EIAs zum Nachweis von Cefotiofur und DFC: Cefotiofur 1: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 5 (EIA-1(C)); Cefotiofur 2 und DFC: unter Verwendung des Antiserumpools von Kan. 6 (EIA-2(CM))

Tabelle 4.10: Relative Kreuzreaktion der Antiseren von Kan. 5 bzw. Kan. 6 gegen Ceftiofur mit anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika

<b><math>\beta</math>-Laktam-Antibiotikum</b>	<b>relative Kreuzreaktion (%) mit Antiserum</b>	
	<b>Kaninchen 5</b>	<b>Kaninchen 6</b>
<b>Bezeichnung</b>		
Cefalexin	-	-
Cefapirin	-	-
Cefoperazon	-	-
Cefazolin	-	-
Cefaclor	-	-
Cefmandol	-	-
Cefadroxil	-	-
Ceftriaxon	-	29
Cefoxitin	-	-
Cephradin	-	-
Cefmetazol	-	-
Cefotaxim	-	10
Cefsulodin	-	-
Cefuroxim	-	20
Cefquinom	-	-
Cefalonium	-	-
Cefacetril	-	-
Penicillin G	-	-
Ampicillin	-	-
Amoxicillin	-	-
Cloxacillin	-	-
Dicloxacillin	-	-
Oxacillin	-	-
DFC	-	5
DFA	-	4
BPO	-	-
Penicillin G + P	-	-
Ceftiofur + P	-	-
DFC + P	-	-
DFA + P	-	-

Legende:

- DFC = Desfuroylceftiofur;  
DFA = Desfuroylceftiofur-Acetamid;  
BPO = durch alkalische Hydrolyse erzeugte Penicillin G Derivate (siehe 3.1.2);  
+ P = enzymatische Hydrolyse durch Penicillinase-Behandlung (siehe 3.1.2);  
- = keine Hemmung durch 0,1 mg/ml der betreffenden Substanz

#### 4.3.2.2 Kompetitiver direkter simultaner EIA zum Nachweis von Ceftiofur (DASP)

Orientierende Versuche zur Erstellung kompetitiver direkter simultaner EIAs auf Basis der DASP-Technik unter Verwendung von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern ergaben, dass kein ausreichendes Signal ( $> 0,3$  Einheiten) für den ceftiofurfreien Nullwert erzielt werden konnte. Da somit ein praktikables Nachweissystem nicht realisierbar war, wurde dieser Testaufbau nicht weiterverfolgt.

### 4.3.3 Anwendbarkeit der entwickelten EIAs

#### 4.3.3.1 Nachweis von CEFALEXIN in künstlich kontaminierter Milch

Die für den kompetitiven direkten simultanen EIA (direkte Beschichtung mit Antiserum) ermittelten Wiederfindungsraten für Cefalexin in künstlich kontaminierter Rohmilch bzw. Vollmilch sind in den Tabellen 4.11a und 4.11b dargestellt. Die künstlich kontaminierten Milchproben wurden in Vierfachansätzen in die EIAs eingesetzt (3.2.6). Die Wiederfindungsraten lagen für Vollmilch zwischen 100,1 % und 123,2 % (EIA Kan. 3) bzw. 101,3% und 128,6 % (EIA Kan. 4). Für Rohmilch lagen die entsprechenden Werte zwischen 105,3 % und 118,6 % (EIA Kan. 3) bzw. 111,5 % und 132,0 % (EIA Kan. 4). Die Variationskoeffizienten lagen jeweils im zufriedenstellenden Bereich.

#### 4.3.3.2 Nachweis von CEFTIOFUR in künstlich kontaminierter Milch

Die für den kompetitiven indirekten EIA ermittelten Wiederfindungsraten für Ceftiofur in künstlich kontaminierter Rohmilch bzw. Vollmilch sind in den Tabellen 4.12a und 4.12b dargestellt. Die künstlich kontaminierten Milchproben wurden in Vierfachansätzen in die EIAs eingesetzt (3.2.6). Die Wiederfindungsraten lagen für Vollmilch zwischen 88,0 % und 101,6 % (EIA-1(C)), Kan. 5) bzw. 96,4 % und 109,4 % (EIA-2(CM), Kan. 6). Die entsprechenden Werte für Rohmilch lagen zwischen 106,2 % und 117,5 % (EIA-1(C)), Kan. 5) bzw. 103,4 % und 138,7 % (EIA-2(CM), Kan. 6). Die Variationskoeffizienten lagen jeweils im zufriedenstellenden Bereich.

Tabelle 4.11a: Wiederfindung von Cefalexin in künstlich kontaminierter wärmebehandelter Vollmilch (kompetitiver direkter simultaner EIA)

Testsystem	Cefalexin-Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	n
EIA Kan. 3	10	12,3	2,8	22,7	123,2	25
	25	27,8	4,1	18,9	111,0	19
	50	53,9	8,1	15,1	107,8	40
	100	100,1	12,7	12,7	100,1	19
	200	214,7	23,5	10,9	107,4	16
EIA Kan. 4	10	12,9	2,6	20,0	128,6	25
	25	28,5	4,9	17,1	114,0	18
	50	54,7	7,9	14,4	109,4	36
	100	101,3	11,5	11,3	101,3	15
	200	212,9	21,2	10,0	106,5	16

Tabelle 4.11b: Wiederfindung von Cefalexin in künstlich kontaminierter Rohmilch (kompetitiver direkter simultaner EIA)

Testsystem	Cefalexin-Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	n
EIA Kan. 3	10	11,9	2,2	18,8	118,6	10
	25	26,8	4,1	15,2	107,1	11
	50	52,7	8,9	17,0	105,3	20
	100	105,4	15,1	14,4	105,4	10
	200	221,1	24,4	11,1	110,6	8
EIA Kan. 4	10	13,2	1,6	12,1	132,0	8
	25	28,0	4,1	14,6	111,9	10
	50	56,2	11,2	19,9	112,5	19
	100	111,5	13,2	11,9	111,5	7
	200	254,4	13,8	5,4	127,2	6

Legende (zu Tabellen 4.11a und 4.11b):

EIA	=	Enzymimmunoassay;
Kan.	=	Kaninchen;
n	=	Anzahl der untersuchten Milchproben im Vierfachansatz;
s	=	Standardabweichung;
VK	=	Variationskoeffizient

Tabelle 4.12a: Wiederfindung von Ceftiofur in künstlich kontaminierter wärmebehandelter Vollmilch (kompetitiver indirekter EIA)

Testsystem	Ceftiofur-Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	n
EIA-1(C), Kan. 5	10	8,8	1,9	22,0	88,0	8
	25	22,3	2,4	10,8	89,2	7
	50	50,5	6,3	12,4	100,9	14
	100	101,6	16,5	16,2	101,6	9
	200	191,7	22,6	11,8	95,8	6
EIA-2(CM), Kan. 6	10	9,6	2,2	23,0	96,4	8
	25	25,4	3,3	13,2	101,6	8
	50	54,7	9,3	16,9	109,4	17
	100	108,5	10,9	10,0	108,5	11
	200	211,0	19,5	9,2	105,5	8

Tabelle 4.12b: Wiederfindung von Ceftiofur in künstlich kontaminierter Rohmilch (kompetitiver indirekter EIA)

Testsystem	Ceftiofur-Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	n
EIA-1(C), Kan. 5	10	11,8	1,5	13,1	117,5	4
	25	27,7	7,1	25,8	110,6	4
	50	57,6	14,6	25,4	115,1	6
	100	106,2	12,8	12,0	106,2	7
	200	216,0	9,5	4,4	108,0	4
EIA-2(CM), Kan. 6	10	13,9	1,1	7,7	138,7	3
	25	29,3	0,6	1,9	117,3	3
	50	58,7	7,3	12,5	117,3	6
	100	113,9	16,6	14,6	113,9	9
	200	206,7	16,3	7,9	103,4	4

Legende (zu Tabellen 4.12a und 4.12b):

EIA	=	Enzymimmunoassay;
Kan.	=	Kaninchen;
EIA-1(C)	=	Enzymimmuntest, erfasst nur Ceftiofur-Muttersubstanz;
EIA-2(CM)	=	Enzymimmuntest, erfasst Ceftiofur plus DFC-Metaboliten;
n	=	Anzahl der untersuchten Milchproben im Vierfachansatz;
s	=	Standardabweichung;
VK	=	Variationskoeffizient

#### 4.3.3.3 Nachweis von CEFTIOFUR in hemmstoffpositiver Anlieferungsmilch

Die in die Untersuchung einbezogenen Milchproben ergaben im mikrobiologischen Testsystem (BRT-Hemmstofftest) ein deutlich positives Ergebnis (teilweise positiv in 1:3 Verdünnung), das nach Behandlung mit Penicillinase schwächer positiv (unverdünnte Milchprobe 005) bis negativ war (unverdünnte Milchproben 031 und 037).

Die beiden zur weiteren Bestätigung der Gruppenidentität „ $\beta$ -Laktam-Antibiotika“ durchgeführten Rezeptor-Bindungstests (SNAP<sup>®</sup> Beta-laktam Test,  $\beta$ beta-s.t.a.r.) führten jeweils zu positiven (SNAP-Test) bzw. negativen ( $\beta$ -Star) Ergebnissen, was mit der unterschiedlichen Nachweisempfindlichkeit der beiden Testsysteme für Ceftiofur übereinstimmte. Penicillase-Behandlung der Milchproben führte teilweise zu negativen Ergebnissen in den Rezeptor-Bindungstests. Die Proben 005 und 031 waren auch nach Penicillinase-Behandlung im SNAP-Test positiv.

Der gruppenspezifische Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen (USLEBER *et al.*, 1998) ergab für alle drei Milchproben ein negatives Ergebnis.

Aufgrund dieses Befundmusters konnten somit  $\beta$ -Laktam-Antibiotika als Hemmstoffursache mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden, gleichzeitig konnten allerdings Penicilline als Verursacher weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse im EIA für Ceftiofur (EIA-1(C)) und im EIA für Ceftiofur plus Metabolit(en) (EIA-2(CM)) sind in der Tabelle 4.13 zusammengefasst. Die Messwerte stimmten unter Berücksichtigung der jeweiligen Nachweisgrenzen in ihrer Größenordnung mit den Ergebnissen des BRT (letzte positive Verdünnungsstufe) sowie den Ergebnissen der Rezeptor-Bindungstests (vor und nach Penicillase-Behandlung) überein. Die Differenz beider Werte in beiden EIAs (in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Ceftiofur-Äquivalente) ist auf die Anwesenheit von Metaboliten in einer Menge von ca. 280 - 720  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in den Milchproben zurückzuführen. Insgesamt wiesen die Milchproben einen Gehalt an Ceftiofur **und** Metaboliten in einem Bereich von ca. 300 - 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  auf, was weit über der derzeitigen gültigen Rückstandshöchstmenge (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) liegt.

Tabelle 4.13: Bestimmung von Cefotiofur und Cefotiofur-Metaboliten in Milch (hemmstoffpositive Rohmilch)

interne Proben- Nummer	Messergebnisse im EIA zum Nachweis von Cefotiofur (ng/ml)			errechneter Gehalt aufgrund der relativen Kreuzreaktion von DFC in EIA-2(CM) von ca. 5 % an DFC Cefotiofur und Metabolit(en) [Gesamtgehalt] (ng/ml)
	EIA-1(C) Cefotiofur-Muttersubstanz polyklonaler Kaninchen- Antikörper (Kan. 5)	EIA-2(CM) Cefotiofur+Metaboliten polyklonaler Kaninchen- Antikörper (Kan. 6)		
A 005/2003	78	114	720	800
A 031/2003	81	108	540	620
A 037/2003	23	37	280	300

Legende:

- DFC = Desfuroylcefotiofur;
- EIA = Enzymimmunoassay;
- EIA-1(C) = Enzymimmuntest, erfasst nur Cefotiofur-Muttersubstanz;
- EIA-2(CM) = Enzymimmuntest, erfasst Cefotiofur plus DFC-Metaboliten;
- Kan. = Kaninchen

#### 4.3.3.4 Nachweis von CEFTIOFUR in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation

Die Ergebnisse der Untersuchung von Milchproben einer mit Cefotiofur behandelten Kuh (dreimalige Applikation des Präparates Excenel<sup>®</sup> RTU, vgl. 3.2.6.4) im mikrobiologischen Testsystem (BRT) und im EIA für Cefotiofur (EIA-1(C)) bzw. in den EIA für Cefotiofur plus Metabolit(en) (EIA-2(CM)) sind in der Tabelle 4.14 zusammengefasst.

Im EIA-1(C) zum Nachweis der Muttersubstanz wurden jeweils negative Ergebnisse (d.h. unter der Nachweisgrenze von  $1,9 \pm 1,0 \mu\text{g/kg}$ ) erzielt. Der EIA-2(CM) zum Nachweis von Cefotiofur und Metabolit(en) allerdings ergab schwach positive Ergebnisse im Bereich der Nachweisgrenze ( $3,3 \pm 1,1 \mu\text{g/kg}$ ) bis zwei Gemelke nach der letzten Applikation. Der Maximalwert von ca.  $10 \mu\text{g/kg}$  wurde am letzten Applikationstag nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der Nachweisempfindlichkeit des EIA-1(C) ergab sich ein Gehalt von ca.  $8 \mu\text{g/kg}$  Cefotiofur-Äquivalenten, gleichbedeutend mit ca.  $160 \mu\text{g/kg}$  Metabolit(en) in der Milchprobe.

Tabelle 4.14: Ergebnisprotokoll nach Applikation des Präparates Excenel® RTU

Ergebnisprotokoll			Präparat Excenel® RTU		
Tag	1 mg Ceftiofur/kg KGW drei Tage lang subcutan	interne Proben- Nr.	Messergebnisse in den EIAs für Ceftiofur (ng/ml)		Ergebnis im BRT
			EIA-1 (C)	EIA-2 (CM)	
Tag 1	einmal täglich	1	1,6	2,6	pos.
Tag 2	einmal täglich	2	neg.	neg.	neg.
Tag 2		3	neg.	2,3	neg.
Tag 3	einmal täglich	4	neg.	2,2	neg.
Tag 3		5	3,0	10,7	-
Tag 4	-	6	neg.	3,0	-
Tag 4	-	7	neg.	neg.	-
Tag 5	-	8	neg.	neg.	-
Tag 5	-	9	neg.	2,0	-
Tag 6	-	10	neg.	neg.	-
Tag 6	-	11	neg.	neg.	-
Tag 7	-	12	neg.	neg.	-
Tag 7	-	13	neg.	neg.	-
Tag 8	-	14	neg.	neg.	-

Legende:

BRT	=	Brillantschwarz-Reduktionstest;
EIA-1(C)	=	Enzymimmuntest, erfasst nur Ceftiofur-Muttersubstanz;
EIA-2(CM)	=	Enzymimmuntest, erfasst Ceftiofur plus DFC-Metaboliten;
KGW	=	Körpergewicht;
neg.	=	unter Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems;
pos.	=	positiv;
-	=	nicht durchgeführt

## 5 DISKUSSION

In der Mastitisprophylaxe und -therapie bei laktierenden Rindern gehören  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nach wie vor zu den national und international am häufigsten eingesetzten Pharmaka. Der Einsatz von Cephalosporinen hat in den letzten Jahren aufgrund ihrer guten Wirksamkeit und kurzen Wartezeiten zugenommen. Damit ist die Möglichkeit einer Rückstandsbildung dieser Substanzen in Milch gegeben (SUHREN *et al.*, 1990; SUNDLOF *et al.*, 1995; MOATS, 1996; MITCHELL *et al.*, 1998; SCHWARZ und WERCKENTHIN, 2001; ZWALD *et al.*, 2004). Neben der postsekretorischen Kontamination (z.B. durch mangelnde Melkhygiene) kommt der sekretorischen Kontamination bei einigen Präparaten besondere Bedeutung zu, beispielsweise durch nicht fachgerechte Verabreichung des Medikamentes (TROLLDENIER und ESCHER, 1978; MCEWEN *et al.*, 1991; RIVIERE, 1992; CULLOR *et al.*, 1994; FINK-GREMMELS und VAN MIERT, 1994).

Antibiotika-Rückstände in der Milch stellen u.a. ein lebensmitteltechnologisches Problem dar, da sie die zur Herstellung fermentierter Produkte notwendigen Starterkulturen schädigen können und somit erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Milch- und Lebensmittelindustrie verursachen können (SUHREN, 1996; HONKANEN-BUZALSKI und SUHREN, 1999). Wichtiger ist aber, dass der Konsum von mit Rückständen belasteten Lebensmitteln ein potentiell (allerdings schwer abschätzbares) Risiko für den Verbraucher darstellt. Durch kontinuierliche orale Aufnahme selbst kleinster Antibiotikamengen wird sowohl die Ausbildung von Allergien als auch die Resistenzentwicklung bzw. -ausbreitung von Mikroorganismen sowie eine mögliche Schädigung der Darmflora diskutiert (MITCHELL und YEE, 1995; HONKANEN-BUZALSKI und SUHREN, 1999; PAIGE *et al.*, 1999).

Zur Vermeidung gesundheitlicher Risiken und damit zum Schutze des Verbrauchers wurden rechtliche Regelungen getroffen, um eine wirksame Kontrolle von Lebensmitteln tierischer Herkunft zu ermöglichen. Im Rahmen der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 der Europäischen Union wurden Rückstandhöchstmengen für die zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Stoffe festgesetzt. Die Molkereien sind verpflichtet durch regelmäßige Kontrollen dafür zu sorgen, dass diese Höchstmengen eingehalten werden. Die Untersuchung von Anlieferungsmilch zeigt, dass der größte Anteil positiver Befunde auf  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zurückzuführen ist (MPR 2003;

Tätigkeitsbericht 2002; HVL, 2003; KERP *et al.*, 2004). Neben dem bloßen Nachweis von „Hemmstoffen“, wie dies bereits seit langem in der Milchgüteverordnung geregelt ist, ist aus lebensmittelrechtlicher Sicht auch eine Identifizierung und Quantifizierung des Rückstandes erforderlich (HEESCHEN, 1993; SUHREN, 2002a+b). Zur Einhaltung gesetzlicher Vorschriften und zur Gewährleistung einer guten Molkereipraxis werden zuverlässige und empfindliche Testsysteme benötigt.

Die zumeist eingesetzten Tests gemäß § 64 LFGB sind zwar empfindlich für  $\beta$ -Laktame, lassen jedoch keine Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände zu. Physikalisch-chemische Verfahren vermögen dies zu leisten (BOISON, 1992; ZOMER *et al.*, 1995; ZOMER *et al.*, 1996; MITCHELL *et al.*, 1998; SCHENCK und CALLERY, 1998), doch aufgrund des zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwandes sind sie nur in beschränktem Umfang anwendbar und werden daher eher als Referenzverfahren eingesetzt (BYGRAVE *et al.*, 1995). So besteht ein Bedarf an schnellen, einfachen und preiswerten Testsystemen, die eine Bestimmung von Art und Menge der Rückstände erlauben. Mittlerweile sind eine Reihe mikrobiologischer und immunchemischer Verfahren als kommerzielle Testsysteme auf dem Markt (LITZ, 1995; KROLL, 2000; KROLL *et al.*, 2000). Deren Erfassungsbreite und Empfindlichkeit für Antibiotika ist jedoch unterschiedlich, so dass kein Test alleine in der Lage ist alle Antibiotika gleichzeitig und ausreichend empfindlich (auf MRL-Niveau) zu erfassen (SUHREN, 2002b).

Zur einfachen und flexiblen Analyse von Antibiotika-Rückständen in Milch wird daher die Anwendung eines sogenannten „integrierten Nachweis- und Differenzierungssystems“ empfohlen. Es basiert auf der Ausnutzung verschiedener Methoden bzw. Methodenkombinationen (mikrobiologische Tests, Rezeptor-Bindungstests, Enzymimmuntests), die positiven Ergebnisse von Screeningtests werden mittels substanzspezifischer Tests weiter untersucht und differenziert (HEESCHEN, 1993; SUHREN *et al.*, 1994; ANONYM, 1996; HEESCHEN und SUHREN, 1996; SUHREN *et al.*, 1996b; USLEBER *et al.*, 2000; SUHREN, 2002a+b; HOLTKÖTTER *et al.*, 2002, KERP *et al.*, 2004).

Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität, bei schneller und einfacher Durchführung, gewinnen enzymimmunologische Verfahren als substanzspezifische Tests in der Lebensmittelhygiene zunehmend an Bedeutung, sie können hier die analytischen Möglichkeiten deutlich verbessern (NEWSOME, 1986; STANKER und BEIER, 1996; SPINKS, 2000; FRANEK und HRUSKA, 2005). Es erscheint daher sinnvoll, verschiedene

enzymimmunologische Verfahren zu entwickeln, die einerseits den gruppenspezifischen Nachweis bestimmter im Hinblick auf die EU-Verordnungen relevanten Substanzgruppen (z.B. Cephalosporine) ermöglichen und andererseits auch den spezifischen Nachweis einzelner Vertreter dieser Gruppe erlauben.

## **5.1 Herstellung der Immunreagenzien**

### **5.1.1 Herstellung der Protein-Konjugate**

Niedermolekulare Substanzen wie die Cephalosporine wirken als Haptene *per se* nicht immunogen und mussten, zur Herstellung wirksamer Immunogene, an Trägerproteine gekoppelt werden.

Da sich niedermolekulare Substanzen nur mit kompetitiven Testsystemen nachweisen lassen, wurden zur Erstellung der EIAs Antigen-Enzymkonjugate (direkter Testaufbau) sowie Festphasenantigene (indirekter Testaufbau) notwendig.

Hierzu wurden in Abhängigkeit von den jeweils vorhandenen funktionellen Gruppen im Molekül (Carboxylgruppe des Proteins und im Dihydrothiazinring der Cephalosporine; Aminogruppe des Proteins und in den Seitenketten von Cefalexin bzw. Ceftiofur) verschiedene Kopplungsmethoden angewandt, die bereits bei Penicillinen erfolgreich angewendet worden waren (USLEBER *et al.*, 1998).

Für die erste Immunisierungsreihe wurde Cefalexin ausgewählt, da dieses die Molekül-Grundstruktur der Cephalosporine am ehesten repräsentiert. Ein weiterer, in der Praxis wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist Ceftiofur, da es aufgrund einer Wartezeit für Milch von null (Ceftiofur-Hydrochlorid = Excenel<sup>®</sup> RTU) bzw. einem Tag (Ceftiofur-Natriumsalz = Excenel<sup>®</sup>) häufig bei laktierenden Rindern zur Anwendung kommt und so daher als zweite Markersubstanz ausgewählt wurde. Cefalexin und Ceftiofur besitzen jeweils in der Seitenkette freie Aminogruppen, die als Kopplungsstelle für verschiedene Kopplungsmethoden genutzt werden können. So wurden sowohl Cefalexin als auch Ceftiofur durch Vernetzung freier Aminogruppen durch das homobifunktionelle Kopplungsreagenz Glutardialdehyd zur Immunogensynthese an KLH gekoppelt (Cefalexin-GA-KLH; Ceftiofur-GA-KLH) (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969). Nach dem gleichen Prinzip wurde Ceftiofur-Natrium zur Festphasenantigen-Synthese an BSA gekoppelt (CeftiofurNa-GA-BSA).

Andere Kopplungsmethoden nutzen die freie Carboxylgruppe des  $\beta$ -Laktamringes, um mit geeigneten Kopplungsreagenzien die Cephalosporine an freie Aminogruppen von Proteinen zu binden. Dieses Prinzip liegt der Carbodiimidmethode (GOODFRIEND *et al.*, 1964; WONG, 1993) zugrunde und wurde in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung der Enzym-Konjugate angewandt. Einschränkend ist jedoch darauf hinzuweisen, dass prinzipiell diese Kopplungsmethode auch über die freie Aminogruppe des Haptens wirken kann. Mit dieser Methode wurden Cefalexin bzw. Ceftiofur an HRP gekoppelt (Cefalexin-C-HRP; Ceftiofur-C-HRP). Nach dem gleichen Prinzip wurde Ceftiofur-Natrium bzw. Ceftiofur-Hydrochlorid zur Festphasenantigen-Synthese an BSA gekoppelt (CeftiofurNa-C-BSA; CeftiofurHCl-C-BSA).

Die UV-Spektren des Cefalexin-HRP-Konjugates sowie des Ceftiofur-HRP-Konjugates wurden im Bereich von 380 - 420 nm vom Absorptionsspektrum des Enzyms geprägt. Es erfolgte keine Überlagerung mit den Eigenabsorptionsspektren der Antibiotika (250 - 320 nm), so dass der Gehalt an HRP in den Konjugaten quantifizierbar war, und so die Kopplungsrate relativ gut abgeschätzt werden konnte. Bei den anderen Protein-Konjugaten war dies aufgrund starker Überlagerung nur als qualitative Abschätzung möglich. Die entscheidende Prüfung erfolgte über die Funktionalität – insbesondere Sensitivität, Spezifität, laborinterne Reproduzierbarkeit und Stabilität – im jeweiligen Testsystem unter Verwendung der spezifischen Antikörper.

### **5.1.2 Gewinnung spezifischer Antiseren und Immunisierungsverlauf**

Zur Gewinnung spezifischer Antiseren wurden jeweils vier Kaninchen mit dem synthetisierten Cefalexin-KLH-Konjugat bzw. dem Ceftiofur-KLH-Konjugat immunisiert. Mit beiden Immunogenen konnte jeweils eine spezifische Immunantwort induziert werden. Bereits ab der vierten Woche nach der Grundimmunisierung waren in allen Kaninchen spezifische Antikörper nachweisbar. Diese Beobachtung stimmt mit Beschreibungen in der Literatur zur Antikörper-Erzeugung gegen bestimmte Cephalosporine überein (BLACKMOORE *et al.*, 1988; KITAGAWA *et al.*, 1988a+b; KACHAB *et al.*, 1992; ROSE *et al.*, 1995; MEYER *et al.*, 1999).

Die mit Cefalexin-KLH immunisierten Tiere wiesen über Wochen einen hohen relativen Serumtiter von 1:100000 auf, während die durch das Ceftiofur-KLH induzierten

Antikörpertiter vergleichsweise niedrig waren, und lediglich nach den erfolgten Restimulierungen jeweils kurzfristig höhere Werte erreichten.

## **5.2 Herstellung der Ceftiofur-Derivate**

Zur Herstellung von Ceftiofur-Metaboliten wurde wie von BECONI-BARKER *et al.* (1995b) beschrieben Ceftiofur mit DTE nach einer modifizierten Methode von CHAPMAN und OWEN (1950) zu DFC und in einem zweiten Reaktionsschritt zu DFA derivatisiert. Alle drei Substanzen (Ceftiofur, DFC, DFA) wurden zum Vergleich ihrer mikrobiologischen Aktivität im BRT und zur Überprüfung auf Reste nicht derivatisierter Muttersubstanz sowie für Kreuzreaktivitätsstudien in die entwickelten EIAs eingesetzt.

Die bei der Überprüfung der mikrobiologischen Aktivität im BRT ermittelte, um einen Faktor von 9 - 27 schwächere Aktivität von DFC und DFA im Vergleich zur Muttersubstanz Ceftiofur, deutet auf die Entstehung von Metaboliten hin und auch aufgrund des chemischen Reaktionsmechanismus wurde davon ausgegangen, dass zum größten Teil der Hauptmetabolit DFC entstanden war. Die festgestellte mikrobiologische Restaktivität lässt sich nicht mit noch vorhandenen Resten der Muttersubstanz Ceftiofur erklären, da die Nachweisgrenze im BRT für Ceftiofur bei 50 - 100 ng/ml liegt, jedoch für die Ansätze in dem für Ceftiofur wesentlich empfindlicheren, entwickelten EIA (EIA-1(C)) mit einer mittleren Nachweisgrenze für Ceftiofur-Muttersubstanz von 1,9 ng/ml (und einer relativen Kreuzreaktion mit DFC von unter 3 %), keine Restgehalt an unveränderter Muttersubstanz detektiert werden konnte.

## **5.3 Entwicklung und Anwendung der EIAs**

Grundsätzlich wäre, analog zu den für die Penicilline publizierten Arbeiten, ein gruppenspezifisches enzymimmunologisches Testsystem zum Nachweis von Cephalosporinen in Milch wünschenswert. Dies scheint jedoch aufgrund der differierenden Strukturvariabilität der Cephalosporine nicht realisierbar zu sein. In der Literatur sind daher bisher keine gruppenspezifischen Antikörper beschrieben worden. Der hier verwendete Ansatz der Immunogensynthese (über die Aminogruppe) zielte darauf ab, bei einfachen Reaktionsschritten möglichst universell für Cephalosporine zu funktionieren.

Zudem wurde die Entwicklung substanzspezifischer Tests für einzelne Vertreter der Cephalosporin-Gruppe (Cefalexin, Cefotiofur) weiterverfolgt, da diese Testsysteme im Rahmen eines routinetauglichen integrierten Nachweissystems einen guten Beitrag leisten können.

### 5.3.1 EIAs zum Nachweis von CEFALEXIN

Die entwickelten Nachweisverfahren für Cefalexin wurden nach dem Prinzip des kompetitiven direkten simultanen EIA erstellt. Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt, zum einen die direkte Beschichtung der Mikrotiterplatten mit gefällttem Antiserum gegen Cefalexin und zum anderen die DASP-Technik. Zur Minimierung von unspezifischen Reaktionen wurden unterschiedliche Synthesereaktionen für die Herstellung von Immunogen und Enzymkonjugat gewählt (VAN WEEMEN und SCHUURS, 1975; MÄRTLBAUER, 1993).

Die Anti-Cefalexin-Seren von zwei Kaninchen mit den höchsten Titern erwiesen sich als recht spezifisch für Cefalexin und zeigten lediglich Kreuzreaktivität mit strukturell sehr ähnlichen Cephalosporinen (Cefaclor, Cefadroxil und Cephadrin). Da jedoch diese Substanzen in der Veterinärmedizin nicht eingesetzt werden, ist der Nachweis von Cefalexin *de facto* ein hochspezifisches System für Cefalexin in Milch.

Um Fehlinterpretationen von Messergebnissen vorzubeugen, wurden bei den erstellten Standardkurven nur Extinktionen von über 30 % und unter 70 % des antibiotikafreien Ansatzes, entsprechend dem quasi-linearen Bereich der Standardkurven, berücksichtigt. Es ergaben sich (bei direkter Beschichtung mit Antiserum) mittlere Nachweisgrenzen für Cefalexin in Milch von 0,8 ng/ml (Antiserumpool Kan. 3) bzw. 0,2 ng/ml (Antiserumpool Kan. 4). Im Testsystem basierend auf der DASP-Technik ergaben sich mittlere Nachweisgrenzen für Cefalexin in Milch von 1,5 ng/ml (Antiserumpool Kan. 3) bzw. 0,1 ng/ml (Antiserumpool Kan. 4). Da mit der aufwendigeren DASP-Technik keine wesentliche Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden konnte, wurde auf eine ausführlichere Charakterisierung dieses Testsystems verzichtet.

Die in dieser Arbeit entwickelten immunchemischen Nachweissysteme für Cefalexin wiesen damit eine deutlich höhere Nachweisempfindlichkeit als das von KITAGAWA *et al.* (1988b) beschriebene enzymimmunologische Nachweisverfahren (mit einer

Nachweisgrenze für Cefalexin in Milch von 30 ng/ml) auf. Auch im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen physikalisch-chemischen Verfahren (PATEL *et al.*, 1988; MEYER *et al.*, 1999; DAESELEIRE *et al.*, 2000a+b; ZHI *et al.*, 2001; GHIDINI *et al.*, 2003) ist die Nachweisempfindlichkeit als sehr gut zu bezeichnen. Der MRL für Cefalexin in Milch (100 µg/kg) wird analytisch weit unterschritten mit einer mittleren Nachweisgrenze von 0,2 µg/kg. Damit ist, neben einer reinen Rückstandkontrolle, ein Einsatz dieses Testsystems beispielsweise im Rahmen von Untersuchungen zur Umweltkontamination (Wasser, Boden) mit Cefalexin vorstellbar.

### **5.3.2 EIAs zum Nachweis von CEFTIOFUR**

Zur Entwicklung von Nachweisverfahren für Ceftiofur wurden nach dem Prinzip der kompetitiven Enzymimmuntests jeweils ein indirektes und ein direktes Verfahren getestet. Basierend auf der DASP-Technik, wurden im direkten Verfahren keine ausreichenden Extinktionswerte für den Nullwert erreicht, so dass ein indirektes Testformat weiterentwickelt wurde. Bei der Überprüfung der Testspezifität ergaben sich für zwei Testsysteme unter Verwendung verschiedener Antiseren analytisch interessante Unterschiede. Während sich das Antiserum von Kan. 5 als hochspezifisch für die Muttersubstanz Ceftiofur erwies und keinerlei Kreuzreaktivität mit anderen β-Laktam-Antibiotika zeigte, ergab sich für das Antiserum von Kan. 6 eine relative Kreuzreaktion mit Ceftiofur-Metaboliten von ca. 5 %. Durch Kombination der beiden Testsysteme konnte somit eine Differenzierung des Gehaltes von Proben (z.B. Milchproben) an Ceftiofur-Muttersubstanz und Metaboliten vorgenommen werden. Bei Feststellung der Abwesenheit von Ceftiofur-Muttersubstanz mit dem ersten Testsystem (EIA-1(C)) waren positive Ergebnisse im zweiten Testsystem (EIA-2(CM)) auf die Anwesenheit von DFC(metaboliten) zurückzuführen, und zwar in ca. 20fach höherer Konzentration als nach Ceftiofur Standards berechnet. Der EIA-2(CM)) erfasste darüber hinaus die strukturverwandten Verbindungen Ceftriaxon, Cefotaxim und Cefuroxim. Da diese Substanzen jedoch in der Veterinärmedizin nicht eingesetzt werden, ist mit den entwickelten Testsystemen eine differenzierende Analytik von Ceftiofur und Metaboliten in Milch möglich.

Auch für die Testsysteme zum Nachweis von Ceftiofur wurden zur Quantifizierung anhand der Standardkurven nur Extinktionen über 30 % und unter 70 % berücksichtigt.

Es ergaben sich mittlere Nachweisgrenzen im indirekten Testsystem für Ceftiofur in Milch von 1,9 ng/ml (EIA-1(C)) bzw. von 3,3 ng/ml (EIA-2(CM)) und für DFC in Milch lag die mittlere Nachweisgrenze bei ca. 100 ng/ml (EIA-2(CM)).

Die in dieser Arbeit entwickelten immunchemischen Nachweissysteme für Ceftiofur wiesen im Vergleich zu anderen Systemen eine ähnliche, häufig sogar eine höhere Nachweisempfindlichkeit auf (ROSE *et al.*, 1995; BUCKLEY und STANKER, 1996; ROSE *et al.*, 1996a+b; STANKER *et al.*, 1996; STANKER *et al.*, 1998).

Auch im Vergleich zu physikalisch-chemischen Nachweissystemen ist das in dieser Arbeit erstellte Verfahren ähnlich sensitiv (vgl. Tabelle 2.10).

### **5.3.3 Anwendbarkeit der entwickelten EIAs**

Die Anwendbarkeit der entwickelten Testsysteme für Cefalexin bzw. Ceftiofur wurde anhand künstlich kontaminierter Milchproben (pasteurisierte Milch, Rohmilch) überprüft. Eine wie bei physikalisch-chemischen Verfahren übliche, aufwendige Probenvorbereitung war nicht erforderlich. Zur Minimierung unspezifischer Einflüsse der Probenmatrix auf das Testsystem erwies es sich als ausreichend, die Milchproben durch Zentrifugieren zu entfetten. Verglichen mit anderen EIAs für Antibiotika (FLOß, 1977; SCHNAPPINGER, 1992; STANKER *et al.*, 1998), in denen die Proben noch mit Puffer verdünnt werden mussten, stellt dieses eine einfache Maßnahme dar. Die Wiederfindungsraten für Cefalexin in einem Dotierungsbereich von 10 - 200 ng/ml lagen bei 100,1 % bis 132,0 %. Die Wiederfindungsraten für Ceftiofur im gleichen Dotierungsbereich lagen bei 88,0 % bis 138,7 %. Die Variationskoeffizienten entsprachen der vom Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food geforderten Reproduzierbarkeit für Rückstandsanalysen im Bereich von  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg} \leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$  (CCRVDF, 2003).

Die praktische Anwendbarkeit der entwickelten EIAs für Ceftiofur wurde zusätzlich an hemmstoffpositiven Anlieferungsmilchproben aus der Tätigkeit des HVL untersucht. Die Übereinstimmung zwischen den Ceftiofur-EIAs (Messwert) und dem BRT-Hemmstofftest (letzte positive Verdünnungsstufe) war gut. Insgesamt wiesen die untersuchten Anlieferungsmilchproben einen Gehalt an Ceftiofur und Metaboliten in einem Bereich von ca. 300 - 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  auf. Dieser Befund deutet auf eine nicht fachgerechte Applikation des Medikaments hin, denkbar wäre eine intramammäre Applikation. Nach MRL-Summary

der EU (EMA, 1999a; EMA, 2002a) kommt als Rückstandsbildner bei fachgerechter (d.h. bei Rindern subcutaner) Applikation von Ceftiofur-Präparaten praktisch nur der Metabolit DFC in der Milch vor, die Rückstandshöchstmenge gilt für die Summe aller den  $\beta$ -Laktamring enthaltenden und als DFC gemessenen Rückstände. Höchstmengenüberschreitungen um ein Vielfaches des MRL-Wertes – die derzeit gültige Rückstandshöchstmenge liegt bei 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (EWG Verordnung Nr. 2377/90 vom 26. Juni 1990) – heben die Bedeutung regelmäßiger Hemmstoffuntersuchungen hervor. An dieser Stelle sei auch auf die generelle Problematik des Ceftiofur-Nachweises in der Routinekontrolle hingewiesen.

Zudem wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer, der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. K. Doll) ein Anwendungsversuch zum Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur und Ceftiofur-Metaboliten nach therapeutischer Applikation des Präparates Excenel<sup>®</sup> RTU durchgeführt. Eine Milchkuh wurde nach Herstellerempfehlung behandelt. Die Einzelgemelke wurden mittels der EIAs untersucht. Ein Maximalwert von ca. 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wurde am letzten Applikationstag nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der Nachweisempfindlichkeit des EIA-1(C) ergab sich ein Gehalt von ca. 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Ceftiofur-Äquivalenten, gleichbedeutend mit ca. 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  DFC(metaboliten) in der Milchprobe. Die Beobachtung, dass Individualwerte die maximale Rückstandsmenge überschreiten können, deckt sich mit anderen Angaben in der Literatur (ERSKINE *et al.*, 1995; PHARMACIA & UPJOHN COMPANY, 1998; STANKER *et al.*, 1998; EMA, 1999a).

Mit den entwickelten EIAs ist somit eine differenzierende Analytik von Ceftiofur und seines Hauptmetaboliten DFC in der Milch möglich. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit einer Ursachenaufklärung bei Rückstands-positiven Milchproben von Bedeutung: Bei Feststellung der Abwesenheit von Ceftiofur mit dem EIA-1(C) lassen positive Ergebnisse im EIA-2(CM) auf die Anwesenheit von DFC(metaboliten) schließen, und zwar in ca. 20fach höherer Konzentration als nach Ceftiofur-Standardkurve berechnet. Bei nicht-fachgerechter Anwendung von Ceftiofur ist mit hohen Rückstandskonzentrationen der Muttersubstanz und Metaboliten in Milch zu rechnen. Bei fachgerechter Anwendung ist zwar Ceftiofur als Muttersubstanz in Milch nicht nachweisbar ( $< 1,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), es ergaben sich aber Hinweise auf deutliche Rückstandskonzentrationen von DFC. Ein Ziel ist die weitere Optimierung des Nachweises, d.h. die Entwicklung eines spezifischen Tests für DFC.

Mit einer Durchführungsdauer von ca. 2,5 h eignen sich die in dieser Arbeit entwickelten Testsysteme zum Nachweis von Cefalexin und Ceftiofur bzw. DFC als Routineverfahren zum Laborscreening auf Rückstände dieser Substanzen. Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität stellen enzymimmunologische Verfahren eine wertvolle Ergänzung im Rahmen eines routinetauglichen integrierten Nachweissystems dar und können zur Identifizierung und Quantifizierung Rückstands-verursachender Substanzen beitragen. Die hier vorgestellten EIAs zum Nachweis von Cefalexin bzw. Ceftiofur erwiesen sich als gut geeignet zum Nachweis der nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 mit Höchstmengen in Milch belegten Cephalosporine Cefalexin sowie Ceftiofur und seiner Metaboliten. Die Nachweisbarkeit liegt weit unterhalb der gesetzlich vorgeschriebenen Höchstgrenzen von jeweils 100 µg/kg. Mit diesen Charakteristika sind die in dieser Arbeit entwickelten enzymimmunologischen Testsysteme anderen Verfahren in Bezug auf Nachweisempfindlichkeit, Testdurchführung und Kosteneffektivität überlegen. Eine Anwendung ist nicht auf die Matrix Milch beschränkt, nach entsprechender Probenaufbereitung wäre auch eine Untersuchung von Fleisch bzw. Fleischerzeugnissen auf entsprechende Rückstände denkbar.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis der im Hinblick auf die EU-Verordnungen relevanten Cephalosporine Ceftiofur und Cefalexin in Milch.

Zur Herstellung immunogener Protein-Konjugate wurde jeweils Cefalexin bzw. Ceftiofur mittels Glutardialdehyd an ein Trägerprotein (KLH) gekoppelt. Jeweils vier Kaninchen wurden mit dem Cefalexin-KLH-Konjugat (1,7 mg/Tier) bzw. dem Ceftiofur-KLH-Konjugat (2,3 mg/Tier) immunisiert.

Zur Herstellung von Antigen-Enzymkonjugaten wurden Cefalexin bzw. Ceftiofur mittels Carbodiimid an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Ceftiofur-Proteinkonjugate als Festphasenantigene für den kompetitiven indirekten Enzymimmuntest (EIA) wurden durch Kopplung von Ceftiofur an BSA mittels Carbodiimid bzw. mittels Glutardialdehyd hergestellt.

Mit dem Cefalexin-HRP-Konjugat und den verschiedenen Kaninchen-Antiseren wurden kompetitive direkte EIAs erstellt. Es zeigte sich, dass der direkte EIA unter Verwendung gefällter Antiseren als Beschichtung das empfindlichste Testsystem mit einer mittleren Nachweisgrenze für Cefalexin von  $0,2 \pm 0,1 \mu\text{g/kg}$  darstellte (Antiserum Kaninchen 4). Der Nachweis von Cefalexin im kompetitiven direkten EIA unter Verwendung der DASP-Technik erbrachte im Vergleich dazu keine Verbesserung der Testempfindlichkeit.

Mit dem Ceftiofur-HRP-Konjugat und den verschiedenen Kaninchen-Antiseren wurden kompetitive direkte EIAs auf Basis der DASP-Technik erstellt. Mit dem Ceftiofur-BSA-Konjugat und den verschiedenen Kaninchen-Antiseren wurden kompetitive indirekte EIAs erstellt. Der indirekte EIA unter Verwendung von Ceftiofur-C-BSA als Beschichtungsantigen erwies sich als empfindlichstes Testsystem, mit einer mittleren Nachweisgrenze für Ceftiofur von  $1,9 \pm 1,0 \text{ mg/kg}$  (Antiserum Kaninchen 5) bzw.  $3,3 \pm 1,1 \mu\text{g/kg}$  (Antiserum Kaninchen 6).

Zur Bestimmung der Spezifität des kompetitiven direkten EIA zum Nachweis von Cefalexin bzw. des kompetitiven indirekten EIA zum Nachweis von Ceftiofur wurde der Einfluss anderer Cephalosporine sowie strukturähnlicher Penicilline auf die Testsysteme untersucht. Hierzu wurden ca. 30 Substanzen, darunter auch chemisch (hydrolytisch) oder enzymatisch (Penicillinase) gespaltene Antibiotika sowie durch chemische Derivatisierung

von Ceftiofur hergestellte Metaboliten (Desfuroylceftiofur = DFC, Desfuroylceftiofur-Acetamid = DFA) getestet. Die EIAs zum Nachweis von Cefalexin zeigten in Abhängigkeit vom verwendeten Antiserum (Kaninchen 3 bzw. Kaninchen 4) neben der Reaktion mit Cefalexin eine relative Kreuzreaktion mit den in der Veterinärmedizin nicht zugelassenen Cephalosporinen Cefaclor (31 % bzw. 53 %), Cefadroxil (55 % bzw. 22 %) und Cephradin (82 % bzw. 73 %). Das Testsystem erwies sich somit unter praktischen Gesichtspunkten als spezifisch für den Nachweis von Cefalexin in Milch. Die EIAs zum Nachweis von Ceftiofur zeigten in Abhängigkeit vom verwendeten Antiserum (Kaninchen 5 bzw. Kaninchen 6) unterschiedliche Kreuzreaktivität. Bei Verwendung des Antiserums von Kaninchen 5 erwies sich das Testsystem als hochspezifisch für Ceftiofur. Bei Verwendung des Antiserums von Kaninchen 6 zeigten sich neben der Reaktion mit Ceftiofur relative Kreuzreaktionen mit den in der Veterinärmedizin nicht zugelassenen Cephalosporinen Cefotaxim (10 %), Cefuroxim (20 %) und Ceftriaxon (29 %), sowie mit Ceftiofur-Metaboliten (5 %). Hier wurde eine mittlere Nachweisgrenze für den Ceftiofur-Hauptmetaboliten DFC von  $100 \pm 50 \mu\text{g}/\text{kg}$  ermittelt. Die Kombination beider Testsysteme für Ceftiofur ermöglicht somit eine Differenzierung des Rückstandsgehaltes an Ceftiofur-Muttersubstanz und Metaboliten in Milch.

Die praktische Anwendbarkeit der entwickelten EIAs wurde an künstlich kontaminierter, wärmebehandelter Vollmilch und an Rohmilch geprüft. Milchproben wurden durch Zentrifugieren entfettet und ohne weitere Aufbereitung in den kompetitiven direkten EIA zum Nachweis von Cefalexin bzw. den kompetitiven indirekten EIA zum Nachweis von Ceftiofur eingesetzt (Dotierung jeweils 10 - 200 ng/ml). Die Wiederfindungsraten für Cefalexin lagen in wärmebehandelter Vollmilch bei 100,1 % bis 128,6 % und in Rohmilch bei 105,3 % bis 132,0 %. Die Wiederfindungsraten für Ceftiofur lagen in wärmebehandelter Vollmilch bei 88,0 % bis 109,4 % und in Rohmilch bei 103,4 % bis 138,7 %. Die praktische Anwendbarkeit der entwickelten EIAs zum Nachweis von Ceftiofur wurde zusätzlich bei Anlieferungsmilchproben im Rahmen der Güteprüfung durch den HVL und in einem Anwendungsversuch zum Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur und Ceftiofur-Metaboliten nach therapeutischer Applikation eines ceftiofurhaltigen Präparates bei laktierenden Rindern überprüft.

Die hier vorgestellten EIAs erwiesen sich als gut geeignet zum Rückstandsnachweis dieser beiden Verbindungen entsprechend Verordnung (EWG) Nr. 2377/90. Die Nachweisbarkeit beider Verbindungen lag jeweils deutlich unterhalb der Höchstmenge (MRL:  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

This paper describes the development and application of enzyme immunoassays (EIAs) for the detection of cefalexin and ceftiofur in bovine milk, with regard to the relevant EU-regulations.

For the production of immunogenic protein-conjugates, cefalexin or ceftiofur were each coupled to a carrier-protein (KLH) using glutardialdehyde as the coupling reagent. The cefalexin-KLH-conjugate (1.7 mg/animal) respectively the ceftiofur-KLH-conjugate (2.3 mg/animal) were used to raise antibodies in two groups of each four rabbits.

In order to generate antigen-enzyme-conjugates, the conjugation of cefalexin or ceftiofur to HRP was achieved by a carbodiimide procedure. The synthesis of solid-phase-antigens was achieved by coupling ceftiofur to BSA using as well carbodiimide procedure as glutardialdehyde procedure.

Using the cefalexin-HRP-conjugate and the different rabbit-antisera, competitive direct EIAs were developed. An EIA employing antiserum of one animal (rabbit 4) as the coating-antibody proved to be the most sensitive approach, with an average detection limit for cefalexin of  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . In comparison, no improvement of sensitivity could be achieved for the detection of cefalexin in a competitive direct EIA using a DASP-technique.

Using the ceftiofur-HRP-conjugate and different rabbit-antisera, competitive direct EIAs based on DASP-technique were also developed. However, when using the ceftiofur-BSA-conjugate as the coating-antigen in competitive indirect EIAs, this approach was found to yield the most sensitive test system, with average detection limits determined for ceftiofur of  $1.9 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  and  $3.3 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ , using serum of rabbit 5 and rabbit 6, respectively.

To check specificity of the competitive direct EIA for the detection of cefalexin and the competitive indirect EIA for the detection of ceftiofur, other cephalosporins and structurally related penicillins were tested under the conditions of each immunoassay. A total of about 30 substances was tested, among these some chemically (hydrolysis) or enzymatically (penicillinase) cleaved antibiotics, as well as chemically modified analogues of ceftiofur (e.g., desfuroylceftiofur = DFC, desfuroylceftiofur-acetamide = DFA). The assays for cefalexin showed, depending on the antisera used, relative cross reactions (cefalexin = 100%) with some cephalosporins, which are, however, not approved for use in

veterinary medicine: cefaclor (antiserum rabbit 3: 31 %; antiserum rabbit 4: 53 %), cefadroxile (55 %; 22 %) and cephadrine (82 %; 73 %). Under practical considerations, the EIA for cefalexin was specific for the detection of cefalexin in milk. For ceftiofur specificity varied depending on the antisera used (rabbit 5 or rabbit 6). When using the antiserum from rabbit 5, the competitive indirect EIA was highly specific for ceftiofur. When using the antiserum from rabbit 6 there were cross-reactions with cefotaxime (10 %), cefuroxime (20 %) and ceftriaxone (29 %). These substances are not approved for use in veterinary medicine. More important was that DFC also cross-reacted (5%) in this test version. For this compound, which is the major metabolite of ceftiofur in milk, an average detection limit of  $100 \pm 50 \mu\text{g/kg}$  was found. The combination of both EIA test systems for the detection of ceftiofur therefore enables a differentiation between residues of the parent compound (ceftiofur) and those of the metabolite (DFC) in milk.

The applicability of the EIAs was studied using artificially contaminated milk (pasteurized milk, raw bovine milk, contamination levels 10 - 200 ng/ml each). The samples were defatted by centrifugation and then assayed, without any further treatment, both in the competitive direct EIA for the detection of cefalexin and in the competitive indirect EIA for the detection of ceftiofur. The recovery of cefalexin from pasteurized milk was between 100.1 % and 128.6 %, in raw milk between 105.3 % and 132.0 %, respectively. The recovery of ceftiofur from pasteurized milk was between 88.0 % and 109.4 %, in raw milk between 103.4 % and 138.7 %, respectively. The applicability of the EIAs for the detection of ceftiofur was further tested by analysing inhibitor-positive bulk milk samples obtained from the German milk ordinance and by testing samples of an application trial to investigate the excretion behaviour of ceftiofur and its metabolites after therapeutic treatment of dairy cattle.

The EIAs described here were found to be suitable for the detection of the cephalosporin antibiotics cefalexin and ceftiofur/ceftiofur metabolites in milk. The detection limits of these assays in milk were well below the requirements of European Union regulation 2377/90 concerning maximum residue limits (MRL) for these compounds in milk (MRL:  $100 \mu\text{g/kg}$ ).

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

AARESTRUP, F. M. (1999):

Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals

Int. J. Antimicrob. Agents **12**, 279-285

AARESTRUP, F. M., A. M. SEYFARTH und Ø. ANGEN (2004):

Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark

Vet. Microbiol. **101**, 143-146

AARON, C. S., R. L. YU, P. R. HARBACH, J. M. MAZUREK, D. H. SWENSON, D. KIRKLAND, R. MARSHALL und S. McENANEY (1995a):

Comparative mutagenicity testing of ceftiofur sodium

I. Positive results in *in vitro* cytogenetics

Mutat. Res. **345**, 27-35

AARON, C. S., R. L. YU, J. A. BACON, D. KIRKLAND, S. MCENANEY und R. MARSHALL (1995b):

Comparative mutagenicity testing of ceftiofur sodium

II. Cytogenetic damage induced *in vitro* by ceftiofur is reversible and is due to cell cycle delay

Mutat. Res. **345**, 37-47

AARON, C. S., R. L. YU, P. S. JAGLAN, R. D. ROOF, C. HAMILTON, R. SORG, R. GUDI und A. THILAGAR (1995c):

Comparative mutagenicity testing of ceftiofur sodium

III. Ceftiofur sodium is not an *in vivo* clastogen

Mutat. Res. **345**, 49-56

ABRAHAM, E. P. (1983):

History of  $\beta$ -lactam antibiotics

In: A. L. DEMAINE und N. A. SOLOMON: Antibiotics containing the beta-lactam structure, 1. Auflage, Kap. 1, 1-14

Springer Verlag, Berlin u.a.

ABRAHAM, E. P. und G. G. F. NEWTON (1956):

Experiments on the degradation of cephalosporin C

Biochem. J. **62**, 658-665

ABRAHAM, E. P. und G. G. F. NEWTON (1961a):

New penicillins, cephalosporin C, and penicillinase

Endeavour **20**, 92-100

ABRAHAM, E. P. und G. G. F. NEWTON (1961b):  
The structure of cephalosporin C  
Biochem. J. **79**, 377-393

ABRAHAM, E. P. und G. G. F. NEWTON (1965):  
The cephalosporins  
Adv. Chemother. **2**, 23-90

ADAM, D. und W. CHRIST (1987):  
Antibiotika und Chemotherapeutika.  
In: FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage, 580-625  
B. I. Wissenschaftsverlag, Mannheim u.a.

ADKINSON, N. F. (1990):  
Side-chain specific beta-lactam allergy  
Clin. Exp. Allergy **20**, 445-447

AGBABA, D., S. ERIC, D. ZIVANOV STAKIC und S. VLADIMIROV (1998):  
HPTLC assay of cephalixin and cefaclor in pharmaceuticals  
Biomed. Chromatogr. **12**, 133-135

AIM (AiM, Analytik in Milch Produktions- und Vertriebs-GmbH), München (2004):  
Nachweisempfindlichkeiten der AiM BRT Testsysteme gegenüber ausgewählten Antiinfektiva in Kuhmilch  
Produktinformation (Stand 10/2003, z.T. 2001)

ALLEN, J. C. (1989):  
The value of immunoassays to food analysis  
In: RITTENBURG, J. H.: Development and application of immunoassay for food analysis, Kap. 3, 59-77  
Elsevier Applied Science, London

ALLEN, K. J. und C. POPPE (2002):  
Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by  $\beta$ -lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada  
Can. J. Vet. Res. **66**, 137-144

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

AMODIO, R., M. M. D'ERRICO und G. M. GRASSO (1986):  
Ein Enzymtest zum Nachweis von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in der Milch  
Tecnica Sanitaria **22** (1984), 197-202; Ref. in: Milchwiss. **41**, 600-601

ANDREW, S. M., R. A. FROBISH, M. J. PAAPE und L. J. MATURIN (1997):  
Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and  
examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes  
J. Dairy Sci. **80**, 3050-3057

ANONYM (1995):  
Einsatz des Penzymtests in der Praxis  
Dtsch. Milchwirtsch. **46**, 1344

ANONYM (1996):  
Hemmstoffproblematik – ein aktuelles Thema  
Zweiter VDM/ZDM Workshop zur Milchverordnung  
Dtsch. Milchwirtsch. **47**, 497 - 498

ANTICO, A. und C. MARCOTULLI (2003):  
Occupational contact allergy to ceftiofur  
Allergy **58**, 957-958

ARCHIMBAULT, P., R. FELLOUS und P. HAAS (1979):  
Antibiotic elimination in the milk following intramammary injection of a preparation containing  
cephalexin, neomycin and prednisolone dairy cows  
Elimination d'antibiotiques dans le lait apres injection intramammaire d'une association  
cephalexine-neomycine-prednisolone  
Revue Méd. Vét. **130**, 721-722, 725-734

ARCHIMBAULT, P., C. BOUTIER und R. FELLOUS (1981):  
Pharmacokinetic evaluation of cephalexin in the calf  
Pharmacocinétique de la céphalexine chez le veau  
Revue Méd. Vét. **132**, 765-768, 771-774

ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 LFGB, L 01.00-42 (EG) bis 52  
(EG) (Dezember 1991):  
Analyse und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch, Anhänge I und II der  
Entscheidung der Kommission vom 14. Februar 1991 zur Festlegung bestimmter Analyse- und  
Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch. (91/180/EWG) (ABl 1991, L 93, 1),  
VIII: Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden

ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 LFGB L 01.01-5  
(Februar 1996a):  
Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch, Agar-Diffusions-Verfahren (Brillantschwarz-  
Reduktionstest)

ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 LFGB L 01.00-11  
(Februar 1996b) (Berichtigung: Dezember 2002):  
Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch, Agar-Diffusions-Verfahren mit  
*Bacillus stearothermophilus*, (Brillantschwarz-Reduktionstest)

ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 LFGB L 01.00-6 (Januar 1997a):

Nachweis von Hemmstoffen in Milch, Agar-Diffusions-Verfahren (Blättchentest)

ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 LFGB L 01.00-62 (September 1997b):

Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch, Agar-Diffusions-Verfahren mit *Bacillus cereus* (TTC-Reduktionstest)

AUDICANA, M., G. BERNAOLA, I. URRUTIA, S. ECHECHIPIA, G. GASTAMINZA, D. MUÑOZ, E. FERNÁNDEZ und L. FERNÁNDEZ DE CORRES (1994):

Allergic reactions to betalactams: studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin

Allergy **49**, 108-113

AVRAMEAS, S. (1969):

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde

Immunochem. **6**, 43-52

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK(1969):

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents

Immunochem. **6**, 53-66

BAFM (Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel) (2001):

Ehemals: Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel

Jahresbericht 2001, 107-124

Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Pr. Dr. Teufel; [www.BafM.de](http://www.BafM.de)

BAILEY, A., A. WALKER, A. HADLEY und D. G. JAMES (1971):

Cephalexin – ein neues orales Antibiotikum

Ther. Umsch. **28**, 761-763

BALDO, B. A. (1999):

Penicillins and cephalosporins as allergens – structural aspects of recognition and cross-reactions

Clin. Exp. Allergy **29**, 744-749

BALDO, B. A. (2000):

Diagnosis of allergy to penicillins and cephalosporins

Structural and immunochemical considerations

ACI International **12**, 206-212

BALDO, B. A. und N. H. PHAM (1994):

Structure-activity studies on drug-induced anaphylactic reactions

Chem. Res. Toxicol. **7**, 703-721

- BALDO, B. A. und N. H. PHAM (2002):  
Immunoglobulin E binding determinants on  $\beta$ -lactam drugs  
Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. **2**, 297-300
- BALDO, B. A., Z. ZHAO und N. H. PHAM (2001a):  
Structural determinants of antibiotic allergy  
Curr. Allergy Rep. **1**, 23-31
- BALDO, B. A., N. H. PHAM und A. ZHAO (2001b):  
Chemistry of drug allergenicity  
Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. **1**, 327-335
- BANTING, A., A. MIGNOT, M. A. LEFEBVRE, L. MILLERIOUX, J. STEFFAN und  
T. J. GILBERTSON (1989):  
Plasma profile and pharmacokinetic parameters in calves after single (I.V. and I.M.) and multiple  
dose administration (I.M.) of ceftiofur sodium  
Upjohn Technical Report No. 788-9760-88-018, 201-354
- BARBERIO, A., G. PIOVAN, E. MARSILIO, F. CARPANESE und P. DALVIT (2001):  
Betalactam antibiotics residues detection in milk by solid phase fluorescence immunoassay  
(Parallux)  
Ind. Aliment. **40**, 641-646
- BARTLETT, A., J. C. DEARDEN und P. R. SIBLEY (1996):  
*In vitro* quantification of cross-reactivity between  $\beta$ -lactam antibiobiotics and anti-benzylpenicillin  
antibodies  
Toxicol. in Vitro **10**, 291-295
- BATCHELOR, F. R., J. M. DEWDNEY, R. D. WESTON und A. W. WHEELER (1966):  
The immunogenicity of cephalosporin derivates and their cross-reaction with penicillin  
Immunology **10**, 21-33
- BAUMGART, K. W. und B. A. BALDO (2002):  
Cephalosporin allergy  
N. Engl. J. Med. **346**, 380-381
- BAUMGARTNER, C. (2002):  
Antibiotika mit 0-Tage-Wartezeit für Milch? Gibt's das?  
BbT Amtstierärztlicher Dienst u. Lebensmittelkontrolle **9**, 313
- BECKER, W. (1976):  
Zur Möglichkeit einer Allergenisierung und Auslösung allergischer Erscheinungen nach oraler  
Aufnahme von antibiotikahaltigen Lebensmitteln (Literaturauswertung)  
Arch. Lebensmittelhyg. **27**, 181-185

- BECKER, M., E. ZITTLAU, E. und M. PETZ (2003):  
Quantitative determination of ceftiofur-related residues in bovine raw milk by LC-MS/MS with electrospray ionization  
Eur. Food Res. Technol. **217**, 449-456
- BECONI-BARKER, M. G., K. L. DAVISON, R. E. HORNISH, T. S. ARNOLD, A. L. CRAIGMILL, T. J. GILBERTSON, E. B. SMITH, T. J. VIDMAR, G. A. HOFFMANN und C. L. GATCHELL (1995a):  
[<sup>14</sup>C]Ceftiofur sodium absorption, distribution, metabolism, and excretion in sheep following intramuscular injections  
J. Agric. Food Chem. **43**, 1589-1597
- BECONI-BARKER, M. G., R. D. ROOF, L. MILLERIOUX, F. M. KAUSCHE, T. J. VIDMAR, E. B. SMITH, J. K. CALLAHAN, V. L. HUBBARD, G. A. SMITH und T. J. GILBERTSON (1995b):  
Determination of ceftiofur and its desfuroylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography  
J. Chromatogr. B **673**, 231-244
- BECONI-BARKER, M. G., R. D. ROOF, T. J. VIDMAR, R. E. HORNISH, E. B. SMITH, C. L. GATCHELL und T. J. GILBERTSON (1996a):  
Ceftiofur sodium: absorption, distribution, metabolism, and excretion in target animals and its determination by high-performance liquid chromatography  
In: MOATS, W. A. und M. B. MEDINA (Hrsg.)  
ACS Symposium Series 636, Veterinary Drug Residues, Food Safety, 70-84  
American Chemical Society
- BECONI-BARKER, M. G., R. E. HORNISH, T. J. VIDMAR, K. J. DAME und S. A. BROWN (1996b):  
Ceftiofur hydrochloride: plasma and tissue distribution in swine following intramuscular administration at various doses  
J. vet. Pharmacol. Therap. **19**, 192-199
- BECONI-BARKER, M. G., E. B. SMITH, T. S. ARNOLD, R. E. HORNISH, T. J. VIDMAR und C. L. GATCHELL (1997):  
Metabolism of [<sup>14</sup>C]Ceftiofur hydrochloride in swine after intramuscular injections  
J. Agric. Food Chem. **45**, 2606-2611
- BELL, O. und D. SCANNELLA (1994):  
An evaluation of the LacTek Beta-Lactam Milk Screening Kit  
J. Soc. Dairy Technol. **47**, 15-16

- BETTE, P. (1996):  
Prüfung und Bewertung der Unbedenklichkeit von Tierarzneimitteln  
In: FREY H.-H. und W. LÖSCHER  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 1. Auflage,  
Kap. 24, 681-696  
Enke Verlag, Stuttgart
- BEYER, F. (1986):  
Hemmstoffe in der Milch aus technologischer Sicht  
Dtsch. Molkerei-Ztg. **107**, 898-899
- BHUSHAN, R. und G. T. THIONG'O (2002):  
Separation of cephalosporins on thin silica gel layers impregnated with transition metal ions and by reversed-phase TLC  
Biomed. Chromatogr. **16**, 165-174
- BIJEV, A., I. RADEV und Y. BORISOVA (1999):  
Introduction of a pyrrole cycle in cephalosporine structures as approach in the search for new beta-lactame antibiotics  
Pharmazie **54**, 567-570
- BIJEV, A., I. RADEV und Y. BORISOVA (2000):  
Synthesis and antibacterial activity of new cephalosporines containing a pyrrole ring in the N-acyl chain  
Pharmazie **55**, 568-571
- BIJEV, A., A. NANKOV, E. KEULEYAN, R. MARKOVSKA und E. DANEVA (2004):  
Synthesis and preliminary antimicrobial evaluation of new 7-(N-pyrrolyl) derivatives of cephalosporins  
Arzneim.-Forsch./Drug Res. **54**, 119-124
- BLACKALL, P. J., J. L. PAHOFF, C. P. STEPHENS und F. M. DARVILL (1996):  
In-vitro activity of ceftiofur against Australian isolates of the family *Pasteurellaceae* associated with respiratory disease in cattle and pigs  
Aust. Vet. J. **74**, 71
- BLACKMORE, D. J., R. JACKMAN und J. A. MORRIS (1988):  
Method for the production of antigenic protein-hapten conjugates, and antibodies corresponding thereto  
Europäisches Patentamt, European Patent Application  
Application number: 88308919.5; Publication number: 0 309 299 A1;  
Date of publication of application: 29.03.89 Bulletin 89/13
- BLANCA, M und M. J. TORRES (2003):  
Reacciones de hipersensibilidad a antibióticos betalactámicos en la infancia  
Allergol. et Immunopathol. **31**, 103-109

BLANCA, M., J. FERNANDEZ, A. MIRANDA, S. TERRADOS, M. J. TORRES, J. M. VEGA, M. J. AVILA, E. PEREZ, J. J. GARCIA und R. SUAUA (1989):

Cross-reactivity between penicillins and cephalosporins: clinical and immunologic studies  
J. Allergy Clin. Immunol. **83**, 381-385

BLANCA, M., C. MAYORGA, M. J. TORRES, R. WARRINGTON, A. ROMANO, P. DEMOLY, F. SILVIU-DAN, M. MOYA, J. FERNANDEZ und C. JUÁREZ (2002):

Side-chain-specific reactions to betalactams: 14 years later  
Clin. Exp. Allergy **32**, 192-197

BLANCA GOMEZ, M., M. J. TORRES, C. MAYORGA, E. PEREZ-INESTROSA, R. SUAUA, M. I. MONTAÑEZ und C. JUAREZ (2004):

Immediate allergic reactions to betalactams: facts and controversies  
Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. **4**, 261-266

BLANCHIN, M. D., W. T. KOK und H. FABRE (1987):

New detection modes for the determination of cephalosporins and their decomposition products  
Chromatographia **24**, 625-627

BLANCO, M., J. BLANCO, J. E. BLANCO, E. A. GONZÁLES, J. I. GARABAL, A. CANTALAPIEDRA, und A. GOICOA (1993):

Resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* de origen bovino  
Med. Vet. **10**, 154-162

BOBBITT, D. R. und K. W. NG (1992):

Chromatographic analysis of antibiotic materials in food  
J. Chromatogr. **624**, 153-170

BÖTTNER, A., P. SCHMID und R. HUMKE (1995):

In vitro efficacy of cefquinome (INN) and other antiinfective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and the United Kingdom  
Zentralbl. Veterinärmed. B/J. Vet. Med. B **42**, 377-383

BOISON, J. O. (1992):

Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance  
J. Chromatogr. **624**, 171-194

BOISON, J. O. (2001):

Committee on drugs and related topics  
Drug residues in foods, diagnostics and test kits  
J. AOAC Int. **84**, 190-191

BOOTH, J. M. und F. HARDING (1986):

Testing for antibiotic residues in milk  
Vet. Rec. **119**, 565-569

- BOYD, D. B. (1983):  
Substituent effects in cephalosporins as assessed by molecular orbital calculations, nuclear magnetic resonance, and kinetics  
J. Med. Chem. **26**, 1010-1013
- BOYD, D. B., R. B. HERMANN, D. E. PRESTI und M. M. MARSH (1975):  
Electronic structures of cephalosporins and penicillins. 4. Modeling acylation by the  $\beta$ -lactam ring  
J. Med. Chem. **18**, 408-417
- BOYD, D. B., D. K. HERRON, W. H. W. LUNN und W. A. SPITZER (1980):  
Parabolic relationships between antibacterial activity of cephalosporins and  $\beta$ -lactam reactivity predicted from molecular orbital calculations  
J. Am. Chem. Soc. **102**, 1812-1814
- BRADFORD, P. A., P. J. PETERSEN, I. M. FINGERMAN und D. G. WHITE (1999):  
Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease  
J. Antimicrob. Chemother. **44**, 607-610
- BRADY, M. S. und S. E. KATZ (1988):  
Antibiotic/antimicrobial residues in milk  
J. Food Prot. **51**, 8-11
- BRADY, M. S., N. WHITE und S. E. KATZ (1993):  
Resistance development potential of antibiotic/antimicrobial residue levels designated as „safe levels“  
J. Food Prot. **56**, 229-233
- BRANDER, G. C., D. M. PUGH, R. J. BYWATER und W. L. JENKINS (1991):  
The control of infectious diseases: Chemotherapy  
24: Introduction  
25: Penicillins and Cephalosporins  
In: Veterinary applied pharmacology & therapeutics, 5th edition, 415-451  
Baillière Tindall, London
- BRANDRISS, M. W., J. W. SMITH und H. G. STEINMANN (1965):  
Common antigenic determinants of penicillin G, cephalothin and 6-aminopenicillanic acid in rabbits  
J. Immunol. **94**, 696-704
- BRENTROP, H. und E. ALBERS (1995):  
Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch – Praxisbericht über einen beachtenswerten Kontaminationsweg  
Prakt. Tierarzt **76**, 53-56

- BRETZ, T., E. SCHNEIDER, B. KERP und E. USLEBER (2004):  
Untersuchungen zu verschiedenen Reaktionsparametern beim Einsatz von  $\beta$ -Lactamasen zur Wirkstoffidentifizierung in hemmstoffhaltiger Milch  
In: 45. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 582-587
- BROTZU, G. (1948):  
Ricerca su di un nuovo antibiotico  
Lav. Ist. d'Igiene Cagliari **1948**, 1-11
- BROWN, S. A. und E. J. ROBB (1995):  
Plasma disposition of ceftiofur and metabolites after intravenous and intramuscular administration of ceftiofur sodium to calves of various ages  
Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Bovine Pract. **27**, 206-207
- BROWN, S. A., R. J. YANCEY Jr. und J. STEFFAN (1991a):  
Ceftiofur sodium: antimicrobial activity of parent ceftiofur and metabolites  
Acta Vet. Scand. **87 (Suppl.)**, 95-97
- BROWN, S. A., P. S. JAGLAN und A. BANTING (1991b):  
Ceftiofur sodium: disposition, protein-binding, metabolism, and residue depletion profile in various species  
Acta Vet. Scand. **87 (Suppl.)**, 97-99
- BROWN, S. A., S. T. CHESTER und E. J. ROBB (1996):  
Effects of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle  
J. vet. Pharmacol. Therap. **19**, 32-38
- BROWN, S. A., M. PAYNE und E. J. ROBB (1997):  
Session 1: Biopharmaceutics and pharmacokinetics  
Pharmacokinetics of ceftiofur sodium (NAXEL<sup>®</sup>/EXCENEL<sup>®</sup> Sterile Powder CS-SP) in lactating dairy cows  
J. vet. Pharmacol. Therap. **20 (Suppl. 1)**, 21
- BROWN, S. A., S. T. CHESTER, A. K. SPEEDY, V. L. HUBBARD, J. K. CALLAHAN, P. J. HAMLOW, B. HIBBARD und E. J. ROBB (2000):  
Comparison of plasma pharmacokinetics and bioequivalence of ceftiofur sodium in cattle after a single intramuscular or subcutaneous injection  
J. vet. Pharmacol. Therap. **23**, 273-280
- BRUNO, F., R. CURINI, A. DI CORCIA, M. NAZZARI und R. SAMPERI (2001):  
Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk  
J. Agric. Food Chem. **49**, 3463-3470

- BUCKLEY, S. A. und L. H. STANKER (1996):  
Detection of ceftiofur in bovine tissues and fluids by immunoassay  
Abstracts of Papers of the American Chemical Society **211**, 99-AGRO Part 1
- BUNDGAARD, H. (1975):  
Chemical studies related to cephalosporin allergy  
I. Kinetics of aminolysis of cephalosporins and effect of C-3 substituents on  $\beta$ -lactam reactivity  
Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed. **3**, 94-123
- BUNDGAARD, H. (1976a):  
Hydrolysis and intramolecular aminolysis of cephalexin and cephaloglycin in aqueous solution  
Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed. **4**, 25-43
- BUNDGAARD, H. (1976b):  
Chemical studies related to cephalosporin allergy  
II. Competitive amine-catalyzed intra- and intermolecular aminolysis of cephalexin and cephaloglycin in aqueous solution  
Acta Pharm. Suec. **13**, 299-312
- BUSH, K., G. A. JACOBY und A. A. MEDEIROS (1995):  
A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure  
Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1211-1233
- BUSHWAY, R. J. und T. S. FAN (1995):  
Detection of pesticide and drug residues in Food by immunoassay  
Food Tech. **49**, 108-115
- BYGRAVE, J., M. ROSE und J. TARBIN (1995):  
A comparison of screening and quantitative test methods for the determination of penicillin in milk  
Int. Dairy Fed. Spec. Issue **9505**, 266-268
- CABANA, B. E., D. R. VAN HARKEN und G. H. HOTTENDORF (1976):  
Comparative pharmacokinetics and metabolism of cephapirin in laboratory animals and humans  
Antimicrob. Agents Chemother. **10**, 307-317
- CACCIATORE, G., M. PETZ, S. RACHID, R. HAKENBECK und A. A. BERGWERFF (2004):  
Development of an optical biosensor assay for detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x  
Anal. Chim. Acta **520**, 105-115
- CARLI, S., G. PERRETTA, T. BRUSA, A. INVERNIZZI und R. FAUSTINI (1983):  
Comparison of pharmacokinetics of sodium and lysine cephalexin in calves  
J. vet. Pharmacol. Therap. **6**, 181-184

CARLSSON, A. und L. BJÖRCK (1987):

The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

Milchwiss. **42**, 282-285

CCRVDF (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food) (2003):

Review of performance-based criteria for methods of analysis for veterinary drug residues in food  
Joint FAO/WHO food standards programme, 14. Sitzung des CCRVDF, 4. - 7. März, Washington

CHAMBERS, W. H. (1920):

Bactericidal inhibition

I. Germicidal action in milk

J. Bact. **5**, 527-541

CHAN, C. Y., K. CHAN und G. L. FRENCH (1986):

Rapid high performance liquid chromatographic assay of cephalosporins in biological fluids

J. Antimicrob. Chemother. **18**, 537-545

CHAPMAN, J. H. und L. N. OWEN (1950):

Dithiols part IV. The reaction of toluene-p-sulphonates and methanesulphonates with potassium thiolacetate: a new method for the preparation of thiols

J. Chem. Soc. London, 579-585

CHARM, S. E. und R. K. CHI (1982):

Rapid screening assay for beta-lactam antibiotics in milk: collaborative study

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **65**, 1186-1192

CHARM, S. E. und R. CHI (1988):

Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: Collaborative study

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 304-316

CHARM Sciences Inc., Malden USA (o.J.):

ROSA: SL Beta-lactam test for raw commingled milk

ROSA: SL-6 Beta-lactam test for raw commingled milk

CHARM MRL Test for Beta-lactams for screening milk tanker trucks or farm bulk tanks

CHARM II Tests for raw commingled milk at MRL levels

Produktinformation (Homepage 2004)

CHAUVETTE, R. R., E. H. FLYNN, B. G. JACKSON, E. R. LAVAGNINO, R. B. MORIN,  
R. A. MUELLER, R. P. PIOCH, R. W. ROESKE, C. W. RYAN, J. L. SPENCER und E. VAN  
HEYNINGEN (1962):

Chemistry of cephalosporin antibiotics

II. Preparation of a new class of antibiotics and the relation of structure to activity

J. Am. Chem. Soc. **84**, 3401-3402

CHEN, K. C. S. (1986):

Two-dimensional thin-layer chromatography for simultaneous detection of bacterial  $\beta$ -lactam acylases and  $\beta$ -lactamases

Antimicrob. Agents Chemother. **30**, 536-541

CHENAULT, J. R., J. F. MCALLISTER, S. T. CHESTER, K. J. DAME und F. M. KAUSCHE (2001):

Efficacy of ceftiofur hydrochloride administered parenterally for five consecutive days for treatment of acute postpartum metritis in dairy cows

34th Annual Convention Proceedings, American Association of Bovine Practitioners, No. **34**, September 2001; [www.100daycontract.com](http://www.100daycontract.com)

CHENAULT, J. R., J. F. MCALLISTER, S. T. CHESTER Jr., K. J. DAME, F. M. KAUSCHE und E. J. ROBB (2004):

Efficacy of ceftiofur hydrochloride sterile suspension administered parenterally for the treatment of acute postpartum metritis in dairy cows

J. Am. Vet. Med. Assoc. **224**, 1634-1639

CHR. HANSEN GmbH, Lübeck (o.J.):

Sonderdruck zu: Penzym<sup>®</sup>

Penzym-Schnellnachweis für Beta-Lactam Antibiotika

(aus: Chr. Hansen`s Heute, No. 4, April 1994)

Dr. J. Degelaen, Hemmstoffnachweis in der Milch – Warum, wer, wann und wie?

(aus: Deutsche Milchwirtschaft **13**, 1994, Seiten 593-596)

Produktinformation

CHR. HANSEN GmbH, Nienburg (2004):

*Testsysteme*

4. Wirkungsweise, 4.1 Schnelltestsysteme: BetaStar, Penzym (Stand April 2004, Homepage)

*Empfindlichkeiten*

BetaStar, Penzym und BRT-Testsysteme, Nachweisgrenzen und MRL (Stand Mai 2004, email)

*beta s.t.a.r. 25 100 Allgemeine Information*

Hemmstofftestsystem für den raschen Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch (Brief 2004)

Produktinformation 2004

CHRISTIE, G., J. W. COLEMAN, S. NEWBY, A. MCDIARMAID-GORDON, J. P. HAMPSON, A. M. BRECKENRIDGE und B. K. PARK (1988):

A survey of the prevalence of penicillin-specific IgG, IgM, and IgE antibodies detected by ELISA and defined by hapten inhibition, in patients with suspected penicillin allergy and in healthy volunteers

Br. J. clin. Pharmac. **25**, 381-386

CLARKE, C. R., S. A. BROWN, R. N. STREETER, J. M. CLARKE, P. J. HAMLOW, J. K. CALLAHAN, V. L. HUBBARD, A. K. SPEEDY und G. E. BURROWS (1996):  
Penetration of parenterally administered ceftiofur into sterile vs. *Pasteurella haemolytica*-infected tissue chambers in cattle  
J. vet. Pharmacol. Therap. **19**, 376-381

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**, 3349-3355

COPAN P&S (2004):  
Microbial Test Kit  
Produktinformation 2004; Chr. Hansen Homepage [www.mychr-hansen.com](http://www.mychr-hansen.com)  
CMT-Detection Limits  
Produktinformation 2004; Copan Homepage [www.copanusa.com](http://www.copanusa.com)

CORAN, S. A., M. BAMBAGIOTTI-ALBERTI, V. GIANNELLI, A. BALDI, G. PICCHIONI und F. PAOLI (1998):  
Development of a densitometric method for the determination of cefalexin as an alternative to the standard HPLC procedure  
J. Pharm. Biomed. Anal. **18**, 271-274

CP-PHARMA Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf (2001):  
Cefalexin 120 und Cefalexin 600  
Dt. Tierärzteblatt **6**, 698

CRAUSTE-MANCIET, S., J. F. HUNEAU, M. O. DECROIX, D. TOMÉ, R. FARINOTTI und J. C. CHAUMEIL (1997):  
Cefpodoxime proxetil esterase activity in rabbit small intestine: a role in the partial cefpodoxime absorption  
Int. J. Pharm. **149**, 241-249

CROMPTON, B., M. JAGO, K. CRAWFORD, G. G. F. NEWTON und E. P. ABRAHAM (1962):  
Behaviour of some derivatives of 7-aminocephalosporanic acid and 6-aminopenicillanic acid as substrates, inhibitors and inducers of penicillinases  
Biochem. J. **83**, 52-63

CULLMANN, W. (1995):  
Comparative evaluation of orally active antibiotics against community-acquired pathogens – a multi-center study in 5 mediterranean countries  
J. Chemother. **7**, 21-25

CULLOR, J. S. (1993):  
Antibiotic residue tests for mammary gland secretions  
Vet. Clin. Food Anim. **9**, 609-620

CULLOR, J. S., A. VAN EENENNAAM, I. GARDENER, L. PERANI, J. DELLINGER, W. L. SMITH, T. THOMPSON, M. A. PAYNE, L. JENSEN und W. M. GUTERBOCK (1994):  
Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals

J. AOAC Int. **77**, 862-870

CUTTING, J. H., W. M. KIESSLING, F. L. BOND, J. E. MCCARRON, K. S. KREUZER, J. A. HURLBUT und J. N. SOFOS (1995):

Agarose gel electrophoretic detection of six  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk

J. AOAC Int. **78**, 663-667

DAESELEIRE, E., H. DE RUYCK und R. VAN RENTERGHEM (2000a):

Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using LC/MS-MS

Proceedings of Euro Residue IV

Conference on residues of veterinary drugs in food

Veldhoven, The Netherlands, S. 333-338

DAESELEIRE, E., H. DE RUYCK und R. VAN RENTERGHEM (2000b):

Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**, 1404-1409

DASENBROCK, C. O. und W. R. LACOURSE (1998):

Assay for cephapirin and ampicillin in raw milk by high-performance liquid chromatography-integrated pulsed amperometric detection

Anal. Chem. **70**, 2415-2420

DEBACKERE, M. (1995):

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in relation to their residues in milk

IDF, Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel, 28.-31. August 1995, 41-53

DEGELAEN, J. (1994):

Hemmstoffnachweis in Milch

Dtsch. Milchwirtsch. **13**, 593-596

DELAFUENTE, J. C., R. S. PANUSH und J. R. CLADWELL (1979):

Penicillin and cephalosporin immunogenicity in man

Ann. Allergy **43**, 337-340

DEMAIN, A. L. und R. P. ELANDER (1999):

The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future

Antonie van Leeuwenhoek **75**, 5-19

DE OLIVEIRA, A. P., J. L. WATTS, S. A. SALMON und F. M. AARESTRUP (2000):  
Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States  
J. Dairy Sci. **83**, 855-862

DESEO, J. (2000):  
Antibiotic resistance  
Drawing the line  
J. AOAC Int. **78**, 9-10

DESHPANDE, L., M. A. PFALLER und R. N. JONES (2000):  
In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing strains  
Int. J. Antimicrob. Agents **15**, 271-275

DE SIMONE, C., M. MANGANARO, D. MELI, D. RICCA und C. CAPOZZI (1980):  
Influenza degli antibiotici sulla migrazione leucocitaria  
Boll. Ist. Sieroter. Milan. **59**, 612-618

DEWDNEY, J. M. und R. G. EDWARDS (1984):  
Penicillin hypersensitivity – is milk a significant hazard?: a review  
J. R. Soc. Med. **77**, 866-877

DEWDNEY, J. M., L. MAES, J. P. RAYNAUD, F. BLANC, J. P. SCHEID, T. JACKSON, S. LENS und C. VERSCHUEREN (1991):  
Risk assessment of antibiotic residues of  $\beta$ -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential  
Fd. Chem. Toxic. **29**, 477-483

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1996):  
Use of monoclonal antibodies for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk  
In: HAAGSMA, N. und A. RUITER: Euro Residue III: conference on residues of veterinary drugs in food, 382-386  
University of Utrecht

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

DILLON, P. P., S. J. DALY, J. G. BROWNE, B. M. MANNING, E. LOOMANS, A. VAN AMERONGEN und R. O'KENNEDY (2003):  
Application of an immunosensor for the detection of the  $\beta$ -lactam antibiotic, cephalexin  
Food Agr. Immunol. **15**, 225-234

DINNER, A. (1977):

Cephalosporin degradations

J. Med. Chem. **20**, 963-965

DOCIC, M. und G. BILKEI (2003):

Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics

J. Vet. Med. B **50**, 27-30

DOERN, G. V. (1995):

Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens of the respiratory tract

Am. J. Med. **99 (Suppl. 6B)**, 3-7

DRILLICH, M., O. BEETZ, A. PFÜTZNER, M. SABIN, H.-J. SABIN, P. KUTZER, H. NATTERMANN und W. HEUWIESER (2001):

Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows

J. Dairy Sci. **84**, 2010-2017

DRILLICH, M., A. PFÜTZNER, H.-J. SABIN, M. SABIN und W. HEUWIESER (2003):

Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle

Theriogenology **59**, 951-960

DSM Food Specialties, Dortmund (o. J.):

DSM präsentiert BR-Test<sup>®</sup> AS-Brilliant

BR-Test<sup>®</sup> AS Nachweisgrenzen in Kuhrohmlchgemischen (µg/kg bzw. ppb)

Produktinformation

DSM Food Specialties, Dortmund (2004):

BR-Test<sup>®</sup> AS-Brilliant, Testempfindlichkeit – Nachweisgrenzen

BR-Test<sup>®</sup> AS-Brilliant – Nachweisgrenzen in Kuhrohmlchgemischen (µg/kg bzw. ppb)

Delvotest<sup>®</sup> SP, Testempfindlichkeit – Nachweisgrenzen

Delvotest<sup>®</sup> SP – indikative Nachweisgrenzen in ppb (parts per billion oder ng/ml) in Kuhrohmlchgemischen

Delvo-X-Press<sup>®</sup> βL-II, test sensitivity or detection levels

Delvo-X-Press<sup>®</sup> βL-II indicate data on detection limits in ppb (parts per billion or ng/ml) in commingled bovine raw milk

Produktinformation email 2004

DÜRCKHEIMER, W., J. BLUMBACH, R. LATTRELL und K. H. SCHEUNEMANN (1985):

Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der β-Lactam-Antibiotika

Angew. Chemie **97**, 183-205

DÜRCKHEIMER, W., F. ADAM, G. FISCHER und R. KIRNSTETTER (1988):

Recent developments in the field of cephem antibiotics

Adv. Drug Res. **17**, 61-234

DUTTA, M., M. M. BORAH und N. N. DUTTA (2004):  
Adsorptive separation of beta-lactam antibiotics: technological perspectives  
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **86**, 255-278

EDWARDS, R. G., D. A. SPACKMANN und J. M. DEWDNEY (1982):  
Development and use of three new radioallergosorbent tests in the diagnosis of penicillin allergy  
Int. Archs. Allergy appl. Immun. **68**, 352-357

EKINS, R. P. (1985):  
Current concepts and future developments  
In: COLLINS, W. P.: Alternative Immunoassays, Kap. 13, 219-237  
Wiley & Sons, Chichester u.a.

EKINS, R. (1989):  
A shadow over immunoassay  
Nature **340**, 256-258

ELLIS, R. L. (1996):  
Rapid test methods for regulatory programs  
In: BEIER, R. C. und L. H. STANKER (Hrsg.)  
ACS Symposium Series 621, Immunoassays for residue analysis, Food Safety, 44-58  
American Chemical Society

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), Europäische Agentur für die Zulassungsprüfung von Arzneimitteln (1999a):  
EMA/MRL/498/98-FINAL July 1999: Committee for veterinary Medical Products:  
Ceftiofur Summary Report (1) + (2)  
[www.EMA.eu](http://www.EMA.eu)

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), Europäische Agentur für die Zulassungsprüfung von Arzneimitteln (1999b):  
EMA/MRL/627/99-FINAL July 1999: Committee for veterinary Medical Products:  
Cefalexin Summary Report  
[www.EMA.eu](http://www.EMA.eu)

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), Europäische Agentur für die Zulassungsprüfung von Arzneimitteln (2002a):  
EMA/MRL/835/02-FINAL April 2002: Committee for veterinary Medical Products:  
Ceftiofur Summary Report (3)  
[www.EMA.eu](http://www.EMA.eu)

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), Europäische Agentur für die Zulassungsprüfung von Arzneimitteln (2002b):  
EMA/MRL/839/02-FINAL September 2002: Committee for veterinary Medical Products:  
Cefalonium Summary Report (2)  
[www.EMA.eu](http://www.EMA.eu)

ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971)  
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)  
Quantitative assay of immunoglobulin G  
Immunochem. **8**, 871-874

ERSKINE, R. J., R. C. WILSON, J. W. TYLER, K. A. MCCLURE, R. S. NELSON und  
H. J. SPEARS (1995):  
Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental  
*Escherichia coli*-induced mastitis  
Am. J. Vet. Res. **56**, 481-485

ERSKINE, R. J., P. C. BARTLETT, G. L. JOHNSON und L. W. HALBERT (1996):  
Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of  
penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **208**, 258-260

ERSKINE, R. J., R. D. WALKER, C. A. BOLIN, P. C. BARTLETT und D. G. WHITE (2002a):  
Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period  
J. Dairy Sci. **85**, 1111-1118

ERSKINE, R. J., P. C. BARTLETT, J. L. VANLENTE und C. R. PHIPPS (2002b):  
Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle  
J. Dairy Sci. **85**, 2571-2575

ESPINASSE, J. (1993):  
Responsible use of antimicrobials in veterinary medicine: perspectives in France  
Vet. Microbiol. **35**, 289-301

ESPINASSE, J., F. BOST, A. MADELENAT, F. SCHELCHER und J.-F. VALARCHER (1992):  
Efficacite d'une nouvelle cephalosporine (ceftiofur) associee ou non a un antiinflammatoire  
steroidien (succinate de methyl prednisolone) dans un modele experimental de pasteurellose  
respiratoire du veau a *Pasteurella haemolytica* bio-serogroupe A1  
Proc. Am. Assoc. Bov. Pract. **25**, 159-164

EULITZ, C.-M., S. SCHEUERMANN und H.-J. THIER (1965):  
In: ABC Chemie 2.Auflage, 251-1318  
Harri Deutsch Verlag, Frankfurt, Zürich

FABRE, J. M., J. P. MORETAIN, F. ASCHER, P. BROUILLET und X. BERTHELOT (1995):  
Main causes of inhibitors in milk a survey in one thousand french dairy farms  
IDF, Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel,  
28.-31. August 1995, 27-31

FABRE, J. M., L. GARDEY, L. LHERBETTE, M. DE BOISSEON und X. BERTHELOT (2000):  
Détection des résidus de de céfalexine dans le lait en cas d'allongement de la durée du traitement  
par voie intramammaire

Detection of cefalexin residues in milk of animals treated by intramammary route during a period  
longer than recommended

Revue Méd. Vét. **151**, 965-968

FAGERQUIST, C. K. und A. R. LIGHTLIED (2003):

Confirmatory analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid  
chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass  
spectrometry

Rapid Commun. Mass Spectrom. **17**, 660-671

FARAG, S. A. (1998):

Simultaneous liquid chromatographic analysis of the  $\beta$ -lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil,  
cephalexin, ampicillin, and cephadrine in solution

J. AOAC Int. **81**, 381-385

FAUST, S., S. CLARK und L. CHANEY (1994):

Rapid assay system for the detection of beta-lactam residues in milk

DAIRY, Food and Environmental Sanitation **October**, 609

FDA (Food and Drug Administration) (1992):

Implantation or injectable dosage form new animal drugs, ceftiofur sterile powder for injection

Federal Register **57**, 41862

FDA (Food and Drug Administration) (2003):

Implantation or injectable dosage form new animal drugs; ceftiofur crystalline free acid

Federal Register **68**, 60296

FEDESA (European Federation for Animal Health) (2001):

Progress Report on Antimicrobial Resistance, J. Vanhemelrijck

Homepage [www.fedesa.be](http://www.fedesa.be)

FEKNER, T., J. E. BALDWIN, R. M. ADLINGTON, T. W. JONES, C. K. PROUT und  
C. J. SCHOFIELD (2000):

Syntheses of (6S)-Cephalosporins from 6-Aminopenicillanic acid

Tetrahedron **56**, 6053-6074

FINK-GREMMELS, J. und A. S. J. P. A. M. VAN MIERT (1994):

Veterinary drugs: disposition, biotransformation and risk evaluation

Analyst **119**, 2521-2528

FINLAND, M. (1972):

Oral and parenteral cephalosporins: the place of cephalexin in antibacterial therapy

Drugs **3**, 1-8

- FLEMING, A. (1929):  
On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*  
Brit. J. Exp. Pathol. **10**, 226-236
- FLOß, M., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1997):  
Anwendungsstudien enzymimmunchemischer Nachweise für Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten in Kuhmilch  
In: 38. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 633-636
- FOGG, A. G., N. M. FAYAD und C. BURGESS (1979):  
Differential pulse polarographic study of the degradation of cephalexin  
Anal. Chim. Acta **110**, 107-115
- FOUNTAIN, R. H. und A. D. RUSSELL (1969):  
Studies on the mode of action of some cephalosporin derivatives  
J. appl. Bact. **32**, 312-321
- FRANEK, M. und K. HRUSKA (2005):  
Antibody based methods for environmental and food analysis: a review  
Vet. Med. - Czech **50**, 1-10
- FRÈRE, J. M., D. KLEIN und J. M. GHUYSEN (1980):  
Enzymatic method for rapid and sensitive determination of  $\beta$ -lactam antibiotics  
Antimicrob. Agents Chemother. **18**, 506-510
- FRIEDRICH, C. und W.-D. MÜLLER-JAHNKE (1996):  
Vom Schimmelpilz zur modernen Antibiotikatherapie  
DAZ **43**, 57-62
- GALLATI, H. und I. PRACT (1985):  
Peroxidase aus Meerrettich:  
Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten  $H_2O_2$  und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin  
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**; 453-460
- GALLO MARTÍNEZ, L., P. CAMPÍNS FALCÓ und A. SEVILLANO CABEZA (2002):  
Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples  
J. Pharm. Biomed. Anal. **29**, 405-423
- GARCÍA-BRAVO, B., E. GINES und F. RUSSO (1995):  
Occupational contact dermatitis from ceftiofur sodium  
Contact Dermatitis **33**, 62-63

GARCIA, J. J., M. BLANCA, F. MORENO, J. M. VEGA, C. MAYORGA, J. FERNANDEZ, C. JUAREZ, A. ROMANO und E. DE RAMON (1997):  
Determination of IgE antibodies to the benzylpenicilloyl determinant: a comparison of the sensitivity and specificity of three radio allerge sorbent test methods  
J. Clin. Lab. Anal. **11**, 251-257

GARCIA, F., S. JUSTE, M. M. GARCES, P. CARRETERO, J. BLANCO, D. HERRERO und R. PEREZ (1998):  
Occupational allergic contact dermatitis from ceftiofur without cross-reactivity  
Contact Dermatitis **39**, 260

GDCH (Gesellschaft Deutscher Chemiker) (2002):  
Arbeitsgruppe pharmakologisch wirksamer Stoffe, Schnelltestmethoden, Internetausdruck 2004;  
Broschüre über Schnelltestmethoden, [www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/pharma.htm](http://www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/pharma.htm)

GEDEK, W. (1977):  
Erfassung von Cephalosporinen in Rohmilch durch *B.-cereus*-Beta-Lactamase  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **84**, 340-342

GEDEK, W. (1984):  
Hemmstoffe in der Milch: Alte und neue Fragen  
Dtsch. Molkerei-Ztg. **105**, 1779-1787

GEDEK W. (1986):  
Problematik der Antibiotika- und Desinfektionsmittelrückstände in der Milch im Zusammenhang mit Mastitistherapie und -prophylaxe  
Hemmstoffe in der Milch aus tierärztlicher Sicht  
Dtsch. Molkerei-Ztg. **107**, 894-897

GEDEK, W., S. FASTNER und O. GÜNZLER (1975a):  
Antibiotika-Milchspiegelbestimmungen beim Rind nach intrauteriner Verabreichung handelsüblicher Pharmaka  
Tierärztl. Umschau **30**, 223-227

GEDEK, W., P. MATZKE, S. FASTNER und W. HOLLWICH (1975b):  
Rückstände in Milch, Blutserum und Harn nach intrauteriner Verabreichung von Antibiotika-Handelspräparaten an Puerperal-Kühe  
Tierärztl. Umschau **30**, 504-508

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

GILBERTSON, T. J., R. E. HORNISH, P. S. JAGLAN, K. T. KOSHY, J. L. NAPPIER, G. L. STAHL, A. R. CAZERS, J. M. NAPPIER, M. F. KUBICEK, G. A. HOFFMANN und P. J. HAMLOW (1990):

Environmental fate of ceftiofur sodium, a cephalosporin antibiotic. Role of animal excreta in its decomposition

J. Agric. Food Chem. **38**, 890-894

GILBERTSON, T. J., R. L. MEJEUR, F. S. YEIN und P. S. JAGLAN (1995a):

Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk

J. Dairy Sci. **78**, 1032-1038

GILBERTSON, T. J., R. D. ROOF, J. L. NAPPIER, M. J. ZAYA, R. H. ROBINS, D. J. STUART, L. F. KRZEMINSKI und P. S. JAGLAN (1995b):

Disposition of ceftiofur sodium in swine following intramuscular treatment

J. Agric. Food Chem. **43**, 229-234

GILLETTE, G. L. (2001):

Results of a seven-year surveillance of milk safety related to use ceftiofur sodium and ceftiofur hydrochloride

Proc. Annu. Conf. Am. Assoc. Bovine Pract., Conf. Stillwater, OK:

The Association, **34th**, 143-144

GIST-BROCADES GmbH, Dortmund (o.J.):

Delvotest<sup>®</sup> Standard Diffusionstest zum Nachweis von antibakteriellen Substanzen in Milch, Mindest-Nachweisgrenzen mit Delvotest<sup>®</sup> P und Delvotest<sup>®</sup> SP.

Produktinformation

GOODFRIEND, T. L., L. LEVINE und G. D. FASMAN (1964):

Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology

Science **144**, 1344-1346

GRÄFE, U. (1992):

Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegen Antibiotika

Antibiotika für spezielle Anwendungen und Beispiele für Wirkungsoptimierung

In: Biochemie der Antibiotika. Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus, Kap. 6 - 7, 333-361

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg u.a.

GRALNICK, H. R. und M. H. MCGINNIS (1967):

Immune cross-reactivity of penicillin and cephalothin

Nature **216**, 1026-1027

GRAY, J. T., L. L. HUNGERFORD, P. J. FEDORKA-CRAY und M. L. HEADRICK (2004):

Extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* isolates of animal origin

Antimicrob. Agents Chemother. **48**, 3179-3181

- GRIECO, M. H. (1967)  
Cross allergenicity of the penicillins and the cephalosporins  
Arch. Intern. Med. **119**, 141-146
- GRIFFITH, R. S. und H. R. BLACK (1970):  
Cephalexin  
Med. Clin. North Am. **54**, 1229-1244
- GRUBELNIK, A., C. PADESTE und L. TIEFENAUER (2001):  
Highly sensitive enzyme immunoassays for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics  
Food Agric. Immunol. **13**, 161-169
- GRUNWALD, L., G. SUHREN, K. KNAPPSTEIN und M. PETZ (2001):  
Antibiotika-Rückstände in der Milch erkrankter behandelter Kühe: Vergleich unterschiedlicher Screening-Methoden mit quantitativer HPLC  
Lebensmittelchemie **55**, 45
- GUÉRIN-FAUBLÉE, V., G. CARRET und P. HOUFFSCHMITT(2003):  
In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis  
Vet. Rec. **152**, 466-471
- HALE, C. W., G. G. F. NEWTON und E. P. ABRAHAM (1961):  
Derivates of cephalosporin C formed with certain heterocyclic tertiary bases  
The cephalosporin C<sub>A</sub> family  
Biochem. J. **79**, 403-408
- HALLIGAN, S., S. J. BYARD, A. J. SPENCER, T. J. B. GRAY, E. S. HARPUR und F. W. BONNER (1995):  
A study of the nephrotoxicity of three cephalosporins in rabbits using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy  
Toxicol. Lett. **81**, 15-21
- HALSTEAD, S. L., R. D. WALKER, J. C. BAKER. R. E. HOLLAND, G. E. STEIN und J. G. HAUPTMANN (1992):  
Pharmacokinetic evaluation of ceftiofur in serum, tissue chamber fluid and bronchial secretions of healthy beef-bred calves  
Can. J. Vet. Res. **56**, 269-274
- HAMANN, J. und W. HEESCHEN (1995):  
Orientierende Untersuchungen zu Cephalosporinspiegeln in Milch nach intrazisternaler Applikation am laktierenden Rind unter Berücksichtigung von Dosis, Melkregime und Wirkstoff  
Tierärztl. Umschau **50**, 782-788
- HAMILTON-MILLER, J. M. T. (1976):  
Lysis by  $\beta$ -lactam antibiotics: structure-activity relationships in the cephalosporins  
J. appl. Bact. **41**, 419-424

- HAMILTON-MILLER, J. M. T. (1999):  
 $\beta$ -lactams: variations on a chemical theme, with some surprising biological results  
J. Antimicrob. Chemother. **44**, 729-734
- HAMILTON-MILLER, J. M. T. (2000):  
Sir Edward Abraham's contribution to the development of the cephalosporins: a reassessment  
Int. J. Antimicrob. Agents. **15**, 179-184
- HAMILTON-MILLER, J. M. T. und E. P. ABRAHAM (1971):  
Specificities of haemagglutinating antibodies evoked by members of the cephalosporin C family  
and benzylpenicillin  
Biochem. J. **123**, 183-190
- HAMILTON-MILLER, J. M. T., G. G. F. NEWTON und E. P. ABRAHAM (1970a):  
Products of aminolysis and enzymatic hydrolysis of the cephalosporins  
Biochem. J. **116**, 371-384
- HAMILTON-MILLER, J. M. T., E. RICHARDS und E. P. ABRAHAM (1970b):  
Changes in proton-magnetic-resonance spectra during aminolysis and enzymatic hydrolysis of  
cephalosporins  
Biochem. J. **116**, 385-395
- HANAKI, H., Y. YAMAGUCHI, S. NOMURA, I. HARAGA, A. NAGAYAMA und  
K. SUNAKAWA (2004):  
Method of detecting  $\beta$ -lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR)  
Int. J. Antimicrob. Agents **23**, 1-5
- HANSEN, D. E., C. B. CAMPBELL, J. M. BOYLE, N. STEFANIDES, D. WHITSETT und  
G. WILLIAMS (1993):  
Comparison of ceftiofur with various antibiotic-sulfadimethoxine combinations for the treatment of  
undifferentiated bovine respiratory disease  
AGRI Practice **14**, 13-17
- HARBRIDGE, J. B., G. BURTON und J. H. BATESON (1995):  
Synthesis and biological activity of some 3-acryloxymethyl cephalosporins  
Bioorg. Med. Chem. Lett. **5**, 657-662
- HARIHARAN, H., M. COLES, D. POOLE und R. PAGE (2004):  
Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea  
Can. Vet. J. **45**, 605-606
- HARIK-KAHN, R. und W. A. MOATS (1995):  
Identification and measurement of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk: integration of screening kits  
with liquid chromatography  
J. AOAC Int. **78**, 978-986

HARIK-KAHN, R. und W. A. MOATS (1996):  
Detection & measurement of  $\beta$ -Lactam residues  
Interfacing high-performance liquid chromatography with rapid screening kits for the detection and measurement of  $\beta$ -lactam residues  
In: MOATS, W. A. und M. B. MEDINA (Hrsg.)  
ACS Symposium Series 636, Veterinary Drug Residues, Food Safety, 96-107  
American Chemical Society

HARLE, D. G. und B. A. BALDO (1990a):  
Identification of penicillin allergenic determinants that bind IgE antibodies in the sera of subjects with penicillin allergy  
Mol. Immunol. **27**, 1063-1071

HARLE, D. G. und B. A. BALDO (1990b):  
Drugs as allergens: an immunoassay for detecting IgE antibodies to cephalosporins  
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **92**, 439-444

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.  
Appl. Microbiol. **25**, 26-36

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

HEESCHEN, W. und G. SUHREN (1996):  
Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk  
Milchwiss. **51**, 154-160

HELLER, D. N. und M. A. NGOH (1998):  
Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for the confirmation of seven  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk  
Rapid Commun. Mass Spectrom. **12**, 2031-2040

HELLER, D. N., D. A. KAPLAN, N. C. RUMMEL und J. VON BREDOW (2000):  
Identification of cephalosporin metabolites and degradants in bovine milk by electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry  
J. Agric. Food Chem. **48**, 6030-6035

HENDRIKSEN, B. A., M. S. PRESTON und P. YORK (1995):  
Processing effects on crystallinity of cephalexin: characterisation by vacuum microbalance  
Int. J. Pharm. **118**, 1-10

HENDRIX, C., Z. YONGXIN, C. VAN HOUTVEN, J. THOMAS, E. ROETS und J. HOOGMARTENS (1993):

Evaluation of analytical methods: liquid chromatography of cephalexin  
Int. J. Pharm. **100**, 213-218

HEWETT, G. R. (1994):

Sensitivity of *A pleuropneumoniae* and *P multocida* to ceftiofur  
Vet. Rec. **134**, 200

HEWITT, W. L. (1973):

The cephalosporins – 1973  
J. Infect. Dis. **128 (Suppl.)**, 312-319

HIBBARD, B., E. J. ROBB, S. T. CHESTER Jr., K. J. DAME, J. F. BOUCHER und G. R. ALANIZ (2002):

Dose determination and confirmation of a long-acting formulation of ceftiofur (ceftiofur crystalline free acid) administered subcutaneously for the treatment of bovine respiratory disease  
J. vet. Pharmacol. Therap. **25**, 175-180

HITCHCOCK, C. H. S. (1988):

Opportunities and incentives for developing food immunoassays  
in: MORRIS, B. A., M. N. CLIFFORD und R. JACKMAN: Immunoassays for veterinary and food analysis - Bd.1. 3-16  
Elsevier Applied Science, London **ISBN**: 1-85166-138-7

HODGKIN, D. C. und E. N. MASLEN (1961):

The x-ray analysis of the structure of cephalosporin C  
Biochem. J. **79**, 393-402

HOEBEN, D., C. BURVENICH und R. HEYNEMANN (1997):

Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes  
Vet. Immunol. Immunopathol. **56**, 271-282

HOLSTEGE, D. M., B. PUSCHNER, G. WHITEHEAD und F. D. GALEY (2002):

Screening and mass spectral confirmation of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS  
J. Agric. Food Chem. **50**, 406-411

HOLTKÖTTER, C., B. KERP, E. SCHNEIDER, A. STRASSER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2002):

Anwendung eines integrierten Analysensystems zur Differenzierung, Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikarückständen in Milch  
In: 43. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 417-421

HOLYOAK, G. R., S. WANG, G. LIU, T. J. BUNCH, R. C. EVANS und T. D. BUNCH (1998):  
The effects of ceftiofur sodium (Naxcel) on bovine oocyte and preimplantation embryonic development assessed by *in vitro* embryo production techniques  
J. vet. Pharmacol. Therap. **21**, 92-98

HONKANEN-BUZALSKI, T. und G. SUHREN (1999):  
Residues of antimicrobial agents in milk an their significance to public health and milk processing  
IDF Bulletin **345**, Quality and safety of raw milk and its impact on milk and milk products, Proceedings of a conference in Athens, Greece, September 1999, 11-12

HORNISH, R. E. und S. F. KOTARSKI (2002):  
Cephalosporins in veterinary medicine – ceftiofur use in food animals  
Curr. Top. Med. Chem. **2**, 717-731

HORNISH, R. E., P. J. HAMLOW und S. A. BROWN (2003):  
Multilaboratory trial for determination of ceftiofur residues in bovine and swine kidney and muscle, and bovine milk  
J. AOAC Int. **86**, 30-38

HOU, J. P. und J. W. POOLE (1971):  
Review article:  $\beta$ -lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure  
J. Pharm. Sci. **60**, 503-532

HSU, M.-C., Y.-S. LIN und H.-C. CHUNG (1995):  
High-performance liquid chromatographic method for potency determination of cefalexin in commercial preparations and for stability studies  
J. Chromatogr. A **692**, 67-72

HSU, M.-C., H.-C. CHUNG und Y.-S. LIN (1996):  
Liquid chromatographic determination of cefalexin preparations: interlaboratory validation  
J. Chromatogr. A **727**, 239-244

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

HVL (Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.) (2002):  
Jahresbericht 2002  
[www.hvl-alsfeld.de](http://www.hvl-alsfeld.de), [Alsfeld@t-online.de](mailto:Alsfeld@t-online.de)

HVL (Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.) (2003):  
Jahresbericht 2003  
[www.hvl-alsfeld.de](http://www.hvl-alsfeld.de), [Alsfeld@t-online.de](mailto:Alsfeld@t-online.de)

HVL (Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.) (2004):  
Jahresbericht 2004  
www.hvl-alsfeld.de, Alsfeld@t-online.de

IDETEK (1992):  
LacTek quality assurance system  
Produktinformation, IDETEK Inc., Sunnyvale, USA

IDEXX Laboratories (2004):  
Snap Beta-Lactam Test Kit, Produktinformation, IDEXX GmbH, Wörrstadt  
Parallux, IDEXX Food Safety Net<sup>TM</sup>; Homepage 2004 www.idexx.com (Stand 1999)

IDEXX Laboratories (2005):  
Nachweisgrenzen Snap<sup>®</sup> MRL Beta-Lactam Testkit  
Produktinformation, IDEXX GmbH, email vom 14.01.2005

IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA (o.J.):  
SNAP<sup>®</sup> Beta-Lactam Test Kit  
Parallux<sup>TM</sup> Beta Lactam Assay  
Performance Information, Sensitivity, Dose Response Information-Parallux Beta Lactam  
Produktinformation und Gebrauchsinformation; Homepage 2004 www.idexx.com

IDF (International Dairy Federation) (1983):  
Antibiotic Residues in milk  
Doc. **157**

IDF (International Dairy Federation) (1991a):  
Detection and confirmation of inhibitors in milk and milkproducts  
IDF Bulletin No. **258**

IDF (International Dairy Federation) (1991b):  
Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry  
IDF Bulletin No. **264**

IDF (International Dairy Federation) (1993):  
Inhibitory substances in milk-current analytical practice  
Mastitis therapy in relation to antibiotic residues in milk  
Determination of withdrawal of antibiotic substances in Sweden  
Doc. **283**, 69-74

INDELICATO, M. J., T. T. NORVILAS, R. R. PFEIFER, J. W. WHEELER und L. W. WILHAM  
(1974a):  
Substituent effects upon the base hydrolysis of penicillins and cephalosporins. Competitive  
intramolecular nucleophilic amino attack in cephalosporins  
J. Med. Chem. **17**, 523-527

- INDELICATO, M. J., und L. W. WILHAM (1974b):  
Effect of 6- $\alpha$  substitution in penicillins and 7- $\alpha$  substitution in cephalosporins upon  $\beta$ -lactam reactivity  
*J. Med. Chem.* **17**, 528-529
- INDELICATO, M. J., A. DINNER, R. L. PETERS und L. W. WILHAM (1977):  
Hydrolysis of 3-chloro-3-cephems. Intramolecular nucleophilic attack in cefaclor  
*J. Med. Chem.* **20**, 961-963
- IWATA, M., M. KATSUTA, T. TANII, H. TOKIWA und T. MATUHASI (1982):  
Antigenicity of beta-lactam antibiotic preparations: production of IgE antibodies to beta-lactam antibiotic and their cross-reaction within the antibiotic group  
*Int. Archs. Allergy appl. Immunol.* **68**, 35-40
- JACKMAN, R. (1993):  
Strategy for the development and operation of rapid screening methods for residue analysis  
*Anal. Chim. Acta* **275**, 347-351
- JACKMAN, R., J. CHESHAM, S. J. MITCHELL und S. D. DYER (1990):  
Performance of a rapid ELISA for penicillin G in milk  
*J. Soc. Dairy Techn.* **43**, 93-95
- JACKMAN, R., S. J. MITCHELL, S. D. DYER und J. CHESHAM (1991):  
The use of a specific enzyme-linked immunosorbent assay to monitor the persistence of penicillin G residues in milk following intramammary treatment  
*Food Agric. Immunol.* **3**, 3-12
- JACKSON, T, M, und R. P. EKINS (1986):  
Theoretical limitations on immunoassay sensitivity  
Current practice and potential advantages of fluorescent  $\text{Eu}^{3+}$  chelates as non-radioisotopic tracers  
*J. Immunol. Methods* **87**, 13-20
- JACOBS, R. M., J. H. LUMSDEN, J. A. TAYLOR und E. GRIFT (1991):  
Effects of interferents on the kinetic Jaffé reaction and an enzymatic colorimetric test for serum creatinine concentration determination in cats, cows, dogs and horses  
*Can. J. Vet. Res.* **55**, 150-154
- JAGLAN, P. S., M. F. KUBICEK, T. S. ARNOLD, B. L. COX, R. H. ROBINS, D. B. JOHNSON und T. J. GILBERTSON (1989):  
Metabolism of Ceftiofur. Nature of urinary and plasma metabolites in rats and cattle  
*J. Agric. Food Chem.* **37**, 1112-1118

JAGLAN, P. S., B. L. COX, T. S. ARNOLD, M. F. KUBICEK, D. J. STUART und T. J. GILBERTSON (1990):

Liquid chromatographic determination of desfuroylceftiofur metabolite of ceftiofur as residue in cattle plasma

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 26-30

JAGLAN, P. S., F. S. YEIN, R. E. HORNISH, B. L. COX, T. S. ARNOLD, R. D. ROOF und T. J. GILBERTSON (1992):

Depletion of intramuscularly injected ceftiofur from the milk of dairy cattle

J. Dairy Sci. **75**, 1870-1876

JAKSCH, P. (1988):

Der Penzym-Test – eine enzymatische Schnellmethode zum Nachweis von Beta-Lactam Antibiotika in Rohmilch

Dtsch. Molkerei-Ztg. **109**, 898-903

JEFFERY, J. D'A., E. P. ABRAHAM und G. G. F. NEWTON (1960):

Further degradation products of cephalosporin C

Isolation and synthesis of 2-(4-amino-4-carboxybutyl)thiazole-4-carboxylic acid

Biochem. J. **75**:216-223

JEGERLEHNER, T. (1995):

Erfahrungen mit dem SNAP-Test im Einzugsgebiet der ToniLait

Dtsch. Milchwirtsch. **46**, 896-897

JIM, G. K., C. W. BOOKER und P. T. GUICHON (1992):

A comparison of trimethoprim-sulfadoxine and ceftiofur sodium for the treatment of respiratory disease in feedlot calves

Can. Vet. J. **33**, 245-250

JONES, F. S. und R. B. LITTLE (1927):

The bactericidal property of cow's milk

J. Exp. Med. **45**, 319-355

JONES, G. M. und E. H. SEYMOUR (1988):

Cowside antibiotic residue testing

J. Dairy Sci. **71**, 1691-1699

JOURDAN, S. W., A. M. SCUTELLARO, M. C. HAYES und D. P. HERZOG (1996):

Adapting immunoassays to the analysis of food samples

In: BEIER, R. C. und L. H. STANKER (Hrsg.)

ACS Symposium Series 621, Immunoassays for residue analysis, Food Safety, 450-462

American Chemical Society

- JÜLICHER, B. (1992):  
Tierarzneimittelrückstände und Lebensmittelüberwachung – Auswirkungen des EG-Rechtes  
Bundesgesundhb. **35 (6/92)**, 281-286
- JUNG, C. (1996):  
Rückstandskontrolle mit Schnelltestmethoden  
Dtsch. Milchwirtsch. **47**, 543
- KACHAB, E. H., W.-Y. WU und C. B. CHAPMAN (1992):  
The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for cephalixin  
J. Immunol. Meth. **147**, 33-41.
- KATSUTANI, N. und H. SHIONOYA (1993):  
Immunogenicity of various beta-lactam antibiotic-protein conjugates and cross-reactivity of the antibodies produced in guinea pig  
Int. Arch. Allergy Immunol. **100**, 128-134
- KAUSCHE, F. M. und E. J. ROBB (2003):  
A comprehensive review of ceftiofur sodium and hydrochloride formulations for treatment of acute bovine foot rot  
Vet. Ther. **4**, 83-93
- KAUSCHE, F. M., E. J. ROBB, G. ALANIZ, J. W. HALLBERG, A. P. BELSCHNER und S. T. CHESTER (1997):  
Session 7: Regulatory matters  
Safety of dairy milk from cattle treated with ceftiofur sodium (Naxel<sup>®</sup>/Excenel<sup>®</sup> sterile powder) administered intramuscularly at 1.0 mg ceftiofur/kg body weight  
J. vet. Pharmacol. Therap. **20 (Suppl 1)**, 294
- KEEVER, J., R. D. VOYKSNER und K. L. TYCZKOWSKA (1998):  
Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry  
J. Chromatogr. A **794**, 57-62
- KEIZER, G. D., Y. J. BLANKWATER, J. H. P. M. KERKHOF und P. A. VAN PARIDON (1995):  
Delvo-X-Press: detection of  $\beta$ -lactam residues in 7 minutes  
IDF, Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel, 28.-31. August 1995, 244-246
- KELKAR, P. S. und J. T.-C. LI (2001):  
Cephalosporin allergy  
N. Engl. J. Med. **345**, 804-809

KERP, B., C. KRESS, C. SEIDLER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2004):  
Erfahrungen bei der Anwendung eines Identifizierungs- und Quantifizierungssystems für  
Antibiotikarückstände in Milch  
In: 45. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen  
Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 252-257

KESLER, D. J. und D. T. BECHTOL (1999):  
Efficacy of sustained release needle-less ceftiofur sodium implants in treating calves with bovine  
respiratory disease  
Zentralbl. Veterinärmed. B/J. Vet. Med. B **46**, 25-35

KINDRED, T. P. und W. T. HUBBERT (1993):  
Residue prevention strategies in the United States  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **202**, 46-49

KIRST, E. (1992):  
Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf die Verarbeitungseigenschaft der Milch  
Milchpraxis **30**, 190-194

KIRST, E. (1999):  
Lebensmittelhygienische Untersuchungen  
Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch  
Dtsch. Molkerei-Ztg. **120**, 532-540

KISHIYAMA, J. L. und D. C. ADELMAN (1994):  
The cross-reactivity and immunology of  $\beta$ -lactam antibiotics  
Drug Saf. **10**, 318-327

KITAGAWA, T., K. UCHIHARA, W. OHTANI, Y. GOTOH, Y. KOHRI und T. KINOUE  
(1988a):  
New methods for enzyme labelling of antigens and antibodies and for preparing hapten  
immunogens: EIA for detection of cephalexin residues in milk  
in: MORRIS, B. A., M. N. CLIFFORD und R. JACKMAN: Immunoassays for veterinary and food  
analysis - Bd.1. 37-51  
Elsevier Applied Science, London ISBN: 1-85166-138-7

KITAGAWA, T., Y. GOTOH, K. UCHIHARA, Y. KOHRI, T. KINOUE, K. FUJIWARA und  
W. OHTANI (1988b):  
Sensitive enzyme immunoassay of cephalexin residues in milk, hen tissue, and eggs  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 915-920.

KLARMANN, D. (1997):  
Antibiotika-Resistenzen wichtiger Infektionserreger 1996 in Weser-Ems  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **104**, 325-335

KLEIN, G. (1999):

Lebensmittel als potentielle Vektoren für Antibiotikaresistenzen

1. Mitteilung: Bedeutung von Rückständen und ausgewählten Lebensmittelinfektions- und intoxicationserregern

Berl. Münch. Tierärztliche Wschr. **112**, 365-369

KLEIN, G. F., U. STANZL, P. O. FRITSCH und J. M. VARGA (1993):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to the unmodified beta-lactam ring

Allergy **48**, 151-157

KLUGE, K. und F. R. UNGEMACH (1998):

Neue Arzneimittel für Pferde und landwirtschaftliche Nutztiere und Veränderungen auf dem Arzneimittelmarkt seit 1996

Tierärztl. Prax. (G) **26**, 301-306

KNAPPSTEIN, K., G. SUHREN und H.-G. WALTE (2003):

Prevention of antibiotic residues

Influences of milking intervals and frequencies in automatic milking systems on excretion characteristics of different antibiotics in milk

Institute for Hygiene and Food Safety, Federal Dairy Research Centre, Kiel;

[www.automaticmilking.nl](http://www.automaticmilking.nl)

KNECHT, B. G., A. STRASSER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, R. NIESSNER und M. G. WELLER (2004):

Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk

Anal. Chem. **76**, 646-654

KNOTHE, G. und G. A. DETTE (1982):

Neben- und Wechselwirkungen wichtiger Antibiotika

Prakt. Tierarzt **63**, 815-819

KNOTHE, G. und G. A. DETTE (1983):

The current state of cephalosporin antibiotics: microbiological aspects

Infection **11 (Suppl. 1)**, 12-15

KORPIMÄKI, T., J. ROSENBERG, P. VIRTANEN, T. KARSKELA, U. LAMMINMÄKI, M. TUOMOLA, M. VEHNÄINEN und P. SAVIRANTA (2002):

Improving broad specificity hapten recognition with protein engineering

J. Agric. Food Chem. **50**, 4194-4201

KORSRUD, G. O., J. O. BOISON, J. F. M. NOUWS und J. D. MACNEIL (1998):

Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals

J. AOAC Int. **81**, 21-14

KOSHY, K. T. und A. R. CAZERS (1997):

Controlled hydrolysis of ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin; isolation and identification of hydrolysis products

J. Pharm. Sci. **86**, 389-395

KOSIKOWSKI, F. V. und R. A. LEDFORD (1960):

A reverse-phase disk assay test for antibiotics in milk

J. Am. Vet. Med. Assoc. **136**, 297-299

KOTARSKI, S. F., R. E. HORNISH, W. J. SMOLENSKI, S. A. SALMON, S. A. BROWN, F. M. KAUSCHE und E. J. ROBB (2001):

Microbial safety of ceftiofur and its metabolite: instability in the right places

Proc. Annu. Conf. Am. Assoc. Bovine Pract. **34**, 148

KOTARSKI, S. F., R. E. HORNISH, W. J. SMOLENSKI, S. A. SALMON, J. F. CAPUTO, F. M. KAUSCHE, S. A. BROWN, E. J. ROBB, E. S. PORTIS, J. L. WATTS, K. K. THURN, J. L. NAPPIER und J. W. HALLBERG (2002)

457-554 Metabolism and fate of ceftiofur used in food animals

XXII World Buiatrics Congress, 18-23 August, Hannover, Germany, 148

KRAACK, J. und A. TOLLE (1967):

Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch

Milchwiss. **22**, 669-673

KRABISCH und GANGL (2000):

Zur aktuellen Resistenzsituation von Cefoperazon – Auswertung einer deutschlandweiten Multicenterstudie

Sonderdruck aus Tierärztliche Umschau **55**, 515-521

KROKER, R. (1999):

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen

In: LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER

Pharmakotherapie bei Haus- u. Nutztieren, 4. Auflage, Kap. N, 211-225

Paul Parey Verlag, Hamburg, Berlin

KROKER, R., W. LÖSCHER, J. S. ŠIMŮNEK, H. TROLLDENIER und F. R. UNGEMACH (1996):

Chemotherapie bakterieller Infektionen

In: FREY H.-H. und W. LÖSCHER

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 1. Auflage, Kap. 16, 454-508

Enke Verlag, Stuttgart

KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF, E. SCHNEIDER und E. MÄRTBAUER (1999):  
Vergleichsuntersuchung kommerzieller Schnelltests für Betalaktam-Antibiotika in Milch  
In: 40. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen  
Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 330-336

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

KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF, E. SCHNEIDER und E. MÄRTBAUER (2000):  
Evaluation of commercial rapid tests for  $\beta$ -lactam antibiotics in raw milk  
In: VAN GINKEL, L. A. und A. RUITER (Hrsg.)  
National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands  
Euroresidue IV: Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, 8-10 May, 2000, 693-697

KUMAR, A., D. L. MURRAY, C. B. HANNA, T. G. KREINDLER, K. D. JACOBSON,  
J. M. BUNDY, K. WAXMAN, E. F. FINNERTY, D. W. FOLAN Jr., W. R. DRUCKER J. G.  
KANE, M. DURNELL, A. DIMATTIA und C. D. HILL (1988):  
Comparative study of cephalexin hydrochloride and cephalexin monohydrate in the treatment of  
skin and soft tissue infections  
Antimicrob. Agents Chemother. **32**, 882-885

KUMAR, A., R. M. ROCCO, D. K. LEUNG, L. S. JANG, S. KHARADIA, C. YU, K. K. HARA-  
MIKAMI, G. M. JANG und M. PIANI (1996):  
Solid-phase fluorescence immunoassay for the detection of antibiotic residues in milk  
In: BEIER, R. C. und L. H. STANKER (Hrsg.)  
ACS Symposium Series 621, Immunoassays for residue analysis, Food Safety, 450-462  
American Chemical Society

KURZ, S., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1994):  
Entwicklung eines gruppenspezifischen Enzymimmuntests für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika  
In: 35. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen  
Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 206-213

KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN (1989):  
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
Antiinfektiöse Therapie; 1. Antibakterielle Therapie  
1.3 Penicilline; 1.4 Ausweich-Antibiotika bei Penicillin-Resistenz; 1.5 Cephalosporine  
Kap. 16, 436-350  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

LABISCHINSKI, H. (1992):  
Consequences of the interaction of  $\beta$ -lactam antibiotics with penicillin binding proteins from  
sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains  
Med. Microbiol. Immunol. **181**, 241-265

LECAILLON, J. B., M. C. ROUAN, C. SOUPPART, N. FEBVRE und F. JUGE (1982):  
Determination of cefsulodin, cefotiam, cephalixin, cefotaxime, desacetyl-cefotaxime, cefuroxime  
and cefroxadin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography  
J. Chromatogr. **228**, 257-267

LEE, V. J., G. H. MILLER und M. YAGISAWA (1999):  
What's new in the antibiotic pipeline  
Curr. Opin. Microbiol. **2**, 475-482

LEHTOLAINEN, T., A. SHWIMMER, N. Y. SHIPGEL, T. HONKANEN-BUZALSKI und  
S. PYÖRÄLÄ (2003):  
In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in  
Finland and Israel  
J. Dairy Sci. **86**, 3927-3932

LEROY, P., D. DECOLIN, S. NICOLAS, P. ARCHIMBAULT und A. NICOLAS (1989):  
Residue determination of two co-administered antibacterial agents – cephalixin and colistin – in  
calf tissues using high-performance liquid chromatography and microbiological methods  
J. Pharm. Biomed. Anal. **7**, 1837-1846

LESSEL, J. (1996):  
Penicillin-bindende Proteine: das Target der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika  
Wirkungsmechanismus von  $\beta$ -Lactamasen und deren Inhibitoren  
Pharm. uns. Zeit **25**, 17-27

LI, Q. und S. CHEN (1993):  
Studies on electrochemical behaviour of cephalixin  
Anal. Chim. Acta **282**, 145-152

LI, Y.-M., Y. ZHU, D. VANDERGHINSTE, A. VAN SCHEPDAEL, E. ROETS und  
J. HOOGMARTENS (1999):  
Micellar electrokinetic capillary chromatography for the separation of cefalexin and its related  
substances  
Electrophoresis **20**, 127-131

LITZ, S. (1995):  
Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von  
Penicillinen  
Diss. med. vet. München

LODER, B, G. G. F. NEWTON und E. P. ABRAHAM (1961):  
The cephalosporin C nucleus (7-aminocephalosporanic acid) and some of its derivatives  
Biochem. J. **79**, 408-416

- LONGSTRETH, K. L., S. D. ROBBINS, C. SMAVATKUL und N. S. DOE (2004):  
Cephalexin-induced acute tubular necrosis  
Pharmacotherapy. **24**, 808-811
- LOUHI, M., K. INKINEN, V. MYLLYS und M. SANDHOLM (1992):  
Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk  
Zentralbl. Veterinärmed. B/J. Vet. Med. B **39**, 253-262
- LUENGO, J. M. (1995):  
Enzymatic synthesis of hydrophobic penicillins  
J. Antibiot. (Tokyo) **48**, 1195-1212
- LUO, W., E. B. HANSEN Jr., C. Y. W. ANG, J. DECK, J. P. FREEMAN und H. C. THOMPSON Jr. (1997):  
Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in bovine milk by HPLC with fluorescence detection  
J. Agric. Food Chem. **45**, 1264-1268
- MA, Q., J. YANG, X. WU, F. HUANG und L. SUN (2000):  
A selective fluorimetric method for the determination of some  $\beta$ -lactamic antibiotics  
Anal. Lett. **33**, 2689-2699
- MACINTOSH, A. I. (1990):  
Liquid chromatographic determination of cephalosporin residues in milk  
J. AOAC Int. **73**, 880-882
- MACNAB, K. A. (1989):  
Cross allergenicity of penicillins and cephalosporins  
Can. J. Hosp. Pharm. **42**, 81-84
- MACNEIL, J. D. (2000):  
Committee on drugs and related topics  
Drug residues in animal tissues  
J. AOAC Int. **83**, 435-436
- MÄRTLBAUER, E. P. (1988):  
Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen (Aflatoxine, Ochratoxin A und Trichothecene) in Lebensmitteln  
Diss. med. vet., München
- MÄRTLBAUER, E. P. (1992):  
Enzymimmunchemische Verfahren zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen Stoffen in Lebensmitteln: Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung  
Habilitationsschrift, München

- MÄRTLBAUER, E. (1993):  
Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe  
Enke Verlag, Stuttgart
- MÄRTLBAUER, E. (1995):  
Die Hemmstoffproblematik aus Sicht der Analytik  
Milchwirtsch. Ber. **124**, 115-119
- 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**, 225-230
- MAKESWARAN, S., I. PATTERSON und J. POINTS (2005):  
An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry  
Anal. Chim. Acta **529**, 151-157
- MALISCH, R. (1986):  
Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen (Tierarzneimitteln und Futtermittel-Zusatzstoffen) in Lebensmitteln tierischer Herkunft  
1. Mitteilung: Untersuchungsergebnisse, Bezug von Vergleichssubstanzen und generelle Probleme der Analytik  
Dtsch. Lebensm. Rundsch. **82**, 222-226
- MARTH, E. H. (1966):  
Antibiotics in foods – naturally occurring, developed, and added  
Residue Rev. **12**, 65-161
- MARTH, E. H. und B. E. ELLICKSON (1959):  
Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products – a review  
J. Milk Food Technol. **22**, 266-272
- MARZO, A. und L. DAL BO (1998):  
Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications  
J. Chromatogr. A **812**, 17-34
- MASON, I. S. und M. KIETZMANN (1999):  
Cephalosporins – pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology  
Vet. Dermatol. **10**, 187-192

MATSUHASHI, M. (1994):

Utilisation of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and division: membrane enzymes involved in the final steps of peptidoglycan synthesis and the mechanism of their regulation

In: GHUYSEN, J.-M. und R. HAKENBECK: Bacterial Cell Wall, 55-71

In: NEUBERGER, A. und L. L. M. DEENEN: New Comprehensive Biochemistry, Vol. 27  
ELSEVIER, Amsterdam

MCEWEN, S. A., W. D. BLACK und A. H. MEEK (1991):

Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk

J. Dairy Sci. **74**, 2128-2137

MCEWEN, S. A., W. D. BLACK und A. H. MEEK (1992):

Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions

Can. Vet. J. **33**, 527-534

MCGRANE, P., M. T. ROWE und S. ANGER (1996):

Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection of a range of antibiotics in milk

Milchwiss. **51**, 330-332

MCINTOSH, L. J. (1986):

The incidence of antibiotics in herd and retail milks in Scotland 1984-1985

J. Assoc. Publ. Analysts **24**, 81-90

MCNEILLY, P. J., V. B. REEVES und E. J. I. DEVEAU (1996):

Determination of ceftiofur in bovine milk by liquid chromatography

J. AOAC Int. **79**, 844-847

MEDICINE-WORLDWIDE (2002):

Cefalexin

OnVista Media GmbH

Homepage 2005 [www.m-ww.de/pharmakologie/arzneimittel/antiinfektive/antibiotika](http://www.m-ww.de/pharmakologie/arzneimittel/antiinfektive/antibiotika)

MEDINA, M. B., D. J. POOLE und M. R. ANDERSON (1998):

A screening method for  $\beta$ -lactams in tissues hydrolyzed with penicillinase I and lactamase II

J. AOAC Int. **81**, 963-972

MEYER, U. J., Z.-L. ZHI, E. LOOMANS, F. SPENER und M. MEUSEL (1999):

Automated stand-alone flow injection immunoanalysis system for the determination of cephalexin in milk

Analyst **124**, 1605-1610

- MEYER-BURGMAYER, M. (1980):  
Zur Frage unspezifischer Reaktionen bei der Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe  
Diss. med. vet., München
- MIRANDA, A., M. BLANCA, J. M. VEGA, F. MORENO, M. J. CARMONA, J. J. GARCÍA,  
E. SEGUARDO, J. L. JTSTICIA und C. JUAREZ (1996):  
Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain  
J. Allergy Clin. Immunol. **98**, 671-677
- MISZTAL, G., A. SZALAST und H. HOPKALA (1998):  
Thin-layer chromatographic analysis of cephalosporins  
Chem. Anal. (Warsaw) **43**, 357-363
- MITCHELL, M. J. und A. J. YEE (1995):  
Antibiotic use in animals and transfer of drug resistance to humans: should we stop treating  
animals with these drugs?  
Dairy, Food Environ. Sanitation **15**, 484-487
- MITCHELL, M., B. BODKIN und J. MARTIN (1995):  
Detection of beta-lactam antibiotics in bulk tank milk  
J. Food Prot. **58**, 577-578
- MITCHELL, J. M., W. GRIFFITHS, S. A. MCEWEN, W. B. MCNAB und A. J. YEE (1998):  
Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and  
test performance  
J. Food Prot. **61**, 742-756
- MOATS, W. A. (1993):  
Determination of cephapirin and desacetylcephapirin in milk using automated liquid  
chromatographic cleanup and ion-pairing liquid chromatography  
J. AOAC Int. **76**, 535-540
- MOATS, W. A. (1996):  
Determination of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in foods of animal origin  
Abstracts of Papers of the American chemical Societs **211**, 50-AGFD Part 1
- MOATS, W. A. (1997):  
Advances in determination of antibiotic residues  
J. AOAC Int. **80**, 1-4
- MOATS, W. A. (1999a):  
Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by  $\beta$ -lactam  
antibiotics screening tests  
J. AOAC Int. **82**, 1071-1076

- MOATS, W. A. (1999b):  
The effect of processing on veterinary residues in foods  
Adv. Exp. Med. Biol. **459**, 233-241
- MOATS, W. A. und S. A. BUCKLEY (1996):  
Determination of ceftiofur and metabolites in animal tissues and milk using an automated HPLC cleanup  
Abstracts of Papers of the American Chemical Society **211**, 35-AGRO Part 1
- MOATS, W. A. und S. A. BUCKLEY (1998):  
Determination of free metabolites of ceftiofur in animal tissues with an automated liquid chromatographic cleanup  
J AOAC Int. **81**, 709-713
- MOATS, W. A. und R. HARIK-KAHN (1995):  
Liquid chromatographic determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk: a multiresidue approach  
J. AOAC Int. **78**, 49-54
- MOATS, W. A. und R. D. ROMANOWSKI (1998):  
Multiresidue determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up  
J. Chromatogr. A **812**, 237-247
- MOATS, W. A., E. W. HARRIS und N. C. STEELE (1986):  
Depletion of intramuscularly injected procaine penicillin G from tissues of swine. A comparison of HPLC and bioassay procedures  
J. Agric. Food Chem. **34**, 452-456
- MOATS, W. A., R. D. ROMANOWSKI und M. B. MEDINA (1998):  
Identification of  $\beta$ -lactam antibiotics in tissue samples containing unknown microbial inhibitors  
J. AOAC Int. **81**, 1135-1140
- MOATS, W. A., K. L. ANDERSON, J. E. RUSHING und S. BUCKLEY (2000):  
Conversion of cephalixin to deacetylcephalexin in milk and tissues of treated animals  
J. Agric. Food Chem. **48**, 498-502
- MOL, H. (1975):  
Antibiotics in milk  
Antibiotics and some related chemotherapeutic agents, 1. Auflage, Kap. 2, 5-43  
A. A. Balkema Verlag, Rotterdam
- MOORE, C. M., K. SATO und Y. KATSUMATA (1991):  
High-performance liquid chromatographic determination of cephalosporin antibiotics using 0.3 mm I.D. columns  
J. Chromatogr. **539**, 215-220

MORCK, D. W., M. E. OLSON, T. J. LOUIE, A. KOPPE und B. QUINN (1998):  
Comparison of ceftiofur sodium and oxytetracycline for treatment of acute interdigital phlegmon  
(foot rot) in feedlot cattle  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **212**, 254-257

MORETAIN, J. P. und J. BOISSEAU (1989):  
Excretion of penicillins and cephalixin in bovine milk following intramammary administration  
Food Addit. Contam. **6**, 79-89

MORETAIN, J. P. und C. FROGER (1995):  
Penzym 100 und Penzym 50 durch AFNOR validiert  
Dtsch. Milchwirtsch. **46**, 1341-1343

MORIN, R. B., B. G. JACKSON, E. H. FLYNN und R. W. ROESKE (1962):  
Chemistry of cephalosporin antibiotics  
I. 7-aminocephalosporanic acid from cephalosporin C  
Journal of the American Chemical Society **84**, 3400-3401

MORIN, R. B., B. G. JACKSON, R. A. MUELLER, E. R. LAVAGNINO, W. B. SCANLON und  
S. L. ANDREWS (1963):  
Chemistry of cephalosporin antibiotics  
III. Chemical correlation of penicillin and cephalosporin antibiotics  
J. Am. Chem. Soc. **85**, 1896-1897

MORIN, R. B., B. G. JACKSON, E. H. FLYNN, R. W. ROESKE und S. A. ANDREWS (1969):  
Chemistry of cephalosporin antibiotics  
XIV. Reaction of cephalosporin C with nitrosyl chloride  
J. Am. Chem. Soc. **91**, 1396-1400

MPR (Milchprüfring Bayern) (2000):  
Tätigkeitsbericht 1999  
Eigenverlag, München

MPR (Milchprüfring Bayern) (2001):  
Tätigkeitsbericht 2000  
Eigenverlag, München

MPR (Milchprüfring Bayern) (2002):  
Tätigkeitsbericht 2001  
Eigenverlag, München

MPR (Milchprüfring Bayern) (2003):  
Tätigkeitsbericht 2002  
Eigenverlag, München

- MUIR, D. D. und N. WEST (1999):  
 Survey of antibiotic test methods for raw milk  
 Commissioned by the Dairy Industry Federation  
 Hannah Research Institute  
 Manufacturer's sensitivity declaration  
 COPAN P&S Single and P&S Microplate; 23 October 2001  
 Produktinformation (Stand 2001)
- MUSSER, J. M. B. und K. L. ANDERSON (1999):  
 Using drug residue screening tests to investigate antibiotic contamination of milk  
 Vet. Med. **94**, 474-479
- MUSSER, J. M. B., K. L. ANDERSON und W. A. MOATS (2001):  
 Screening method for identification of  $\beta$ -lactams in bovine urine by use of liquid chromatography  
 and a microbial inhibition test  
 Am. J. Vet. Res. **62**, 326-330
- NAGAKURA, N., T. SHIMIZU, T. MASUZAWA und Y. YANAGIHARA (1990):  
 Anti-cephalexin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to cepheims and penams  
 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **93**, 126-132
- NAGAKURA, N., S. SOUMA, T. SHIMIZU und Y. YANAGIHARA (1991):  
 Anti-ampicillin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to various  $\beta$ -lactams  
 J. Antimicrob. Chemother. **28**, 357-368
- NAHMS (National Animal Health Monitoring System) (1997):  
 Antibiotic injection practices on U.S. dairy operations  
 United States Department of Agriculture and Plant Health Inspection Service  
[http://aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy\\_Cattle/d96anti.htm](http://aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Dairy_Cattle/d96anti.htm)
- NAJIB, N. M., M. S. SULEIMAN, Y. M. EL-SAYED und M. E. ABDULHAMEED (1987):  
 High performance liquid chromatographic analysis of cephalixin in serum and urine  
 J. Clin. Pharm. Ther. **12**, 419-426
- NAKAMURA, R. M. und B. A. ROBBINS (1988):  
 Current status of homogenous enzyme immunoassay  
 Journal of Clinical Laboratory Analysis **2**, 51-61
- NAVARRE, C. B., L. ZHANG, G. SUNKARA, S. H. DURAN und U. B. KOMPELLA (1999):  
 Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle  
 J. vet. Pharmacol. Therap. **22**, 13-19
- NEAVES, P. (1999):  
 Monitoring antibiotics in milk – the changing world of test methods  
 British Mastitis Conference, Internetausdruck 2004; [www.iah.bbsrc.ac.uk/bmc/1999](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/bmc/1999)

- NEEFT, J. M. I., J. VERWEIJ, H. G. J. HIRS und E. DE VROOM (1996):  
Cephalosporanic acid 7  $\beta$ -alkylideneammino salts  
Tetrahedron **52**, 11905-11914
- NEU, H. C. (1983):  
Structure-activity relations of new  $\beta$ -lactam compounds and in vitro activity against common bacteria  
Rev. Infect. Dis. **5 (Suppl. 2)**, 319-336
- NEU, H. C. (1992):  
The crisis in antibiotic resistance  
Science **257**, 1064-1073
- NEU, H. C. (1996):  
Safety of cefepime: a new extended-spectrum parenteral cephalosporin  
Am. J. Med. **100 (Suppl. 6A)**, 68-75
- NEWMAN, D. J., G. M. CRAGG und K. M. SNADER (2000):  
The influence of natural products upon drug discovery  
Nat. Prod. Rep. **17**, 215-234
- NEWSOME, W. H. (1986):  
Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69**, 919-923
- NEWTON, G. G. F. und E. P. ABRAHAM (1955):  
Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- $\alpha$ -aminoadipic acid  
Nature **175**, 548
- NEWTON, G. G. F. und E. P. ABRAHAM (1956):  
Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- $\alpha$ -aminoadipic acid  
Biochem. J. **62**, 651-658
- NEWTON, G. G. F. und J. M. T. HAMILTON-MILLER (1967):  
Cephaloridine: chemical and biochemical aspects  
Postgrad. Med. J. **43 (Suppl. 43)**, 10-17
- NEWTON, G. G. F., E. P. ABRAHAM und S. KUWABARA (1967):  
Preliminary observations on the formation and breakdown of "cephalosporic acids"  
Antimicrob. Agents Chemother. **7**, 449-455
- NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1981):  
Recent advances in homogenous and separation-free enzyme immunoassays  
Appl. Biochem. Biotechnol. **6**, 53-64

- NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1982):  
Enzymes as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions  
Mol. Cell. Biochem. **44**, 3-12
- NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):  
Production of steroid antisera in rabbits.  
In: CAMERON, E. H. D., S. G. HILLIER und K. GRIFFITHS: Steroid Immunoassay.  
5th Tenovus Workshop Proc., 87-96  
Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales
- NIGHTINGALE, C. H., D. S. GREENE und R. J. QUINTILIANI (1975):  
Pharmacokinetics and clinical use of cephalosporin antibiotics  
J. Pharm. Sci. **64**, 1899-1927
- NOSEK, J., R. RADIZO und U. KÜCK (1997):  
Produktion von  $\beta$ -Lactamantibiotika durch Mikroorganismen  
Chemie in unserer Zeit **31**, 172-182
- NOUWS, J., H. VAN EGMOND, I. SMULDERS, G. LOEFFEN, J. SCHOUTEN und  
H. STEGEMAN (1999):  
A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels  
Int. Dairy J. **9**, 85-90
- NOVALBOS, A., J. SASTRE, J. CUESTA, M. DE LAS HERAS, M. LLUCH-BERNAL,  
C. BOMBÍN und S. QUIRCE (2001):  
Lack of allergic cross-reactivity to cephalosporins among patients allergic to penicillins  
Clin. Exp. Allergy **31**, 438-443
- OBI, K., A. KOJIMA, H. FUKUDA und K. HIRAI (1995):  
Synthesis and biological activity of a novel class of cephalosporins with a oxadiazolyl  
hydroxypyridone moiety at C-7  
Bioorg. Med. Chem. Lett. **5**, 2777-2782
- O'CALLAGHAN, C. H. (1979):  
Description and classification of the newer cephalosporins and their relationships with the  
established compounds  
J. Antimicrob. Chemother. **5**, 635-671
- OELLERICH, M. (1984):  
Enzyme-immunoassay: a review  
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22**, 895-904
- OKERMAN, L., K. DE WASCH, J. VAN HOOFF und W. SMEDTS (2003):  
Simultaneous determination of different antibiotic residue in bovine and porcine kidneys by solid-  
phase fluorescent immunoassay  
J. AOAC Int. **86**, 236-240

OKKER, H., E. J. SCHMITT, P. L. A. M. VOS, P. SCHERPENISSE, A. A. BERGWERFF und F. H. JONKER (2002):

Pharmacokinetics of ceftiofur in plasma and uterine secretions and tissues after subcutaneous postpartum administration in lactating dairy cows

J. vet. Pharmacol. Therap. **25**, 33-38

OLIVER, S. P., J. L. MAKI und H. H. DOWLEN (1990):

Antibiotic residues in milk following antimicrobial therapy during lactation

J. Food Prot. **53**, 693-696

OLIVER, S. P., B. E. GILLESPIE, S. J. HEADRICK, H. MOOREHEAD, P. LUNN, H. H. DOWLEN, D. L. JOHNSON, K. C. LAMAR, S. T. CHESTER und W. M. MOSELEY (2004a):

Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows

J. Dairy Sci. **87**, 2393-2400

OLIVER, S. P., R. A. ALMEIDA, B. E. GILLESPIE, S. J. HEADRICK, H. H. DOWLEN, D. L. JOHNSON, K. C. LAMAR, S. T. CHESTER und W. M. MOSELEY (2004b):

Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally-induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle

J. Dairy Sci. **87**, 3322-3329

OLSON, S. C., M. G. BECONI-BARKER, E. B. SMITH, R. A. MARTIN, T. J. VIDMAR und L. D. ADAMS (1998):

*In vitro* metabolism of ceftiofur in bovine tissues

J. vet. Pharmacol. Therap. **21**, 112-120

ORDEN, J. A., J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, S. GRACÍA, D. CID und R. DE LA FUENTE (1999):

In vitro activities of cephalosporins and quinolones against *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic dairy calves

Antimicrob. Agents Chemother. **43**, 510-513

OSTERMEIER, S., E. SCHNEIDER, E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1995):

Rapid enzyme immunoassays for the detection of three sulfonamides in milk

Food Agric. Immunol. **7**, 253-258

OWENS, W. E., Z. Y. XIANG, C. H. RAY und S. C. NICKERSON (1990):

Determination of milk and mammary tissue concentrations of ceftiofur after intramammary and intramuscular therapy

J. Dairy Sci. **73**, 3449-3456

- OWENS, W. E., S. C. NICKERSON und C. H. RAY (1999):  
Efficacy of parenterally or intramammarily administered tilmicosin or ceftiofur against *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation  
J. Dairy Sci. **82**, 645-647
- PAIGE, J. C., L. TOLLEFSON und M. MILLER (1997):  
Public health impact on drug residues in animal tissues  
Vet. Human Toxicol. **39**, 162-169
- PAIGE, J. C., L. TOLLEFSON und M. MILLER (1999):  
Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues  
Vet. Clin. Food Anim. **15**, viii, 31-43
- PATEL, Y. P., N. SHAH, I. C. BHOIR und M. SUNDARESAN (1998):  
Simultaneous determination of five antibiotics by ion-pair high-performance liquid chromatography  
J. Chromatogr. A **828**, 287-290
- PAYNE, M. A., S. E. WETZLICH, E. J. ROBB, S. A. BROWN, I. A. GARDNER, J. S. CULLOR und A. L. CRAIGMILL (2004):  
Comparison of the use of regulatory assays and high-performance liquid chromatography for detection of residues of ceftiofur sodium metabolites in tissue specimens of culled dairy cattle  
Am. J. Vet. Res. **65**, 1730-1733
- PÉHOURECQ, F. und C. JARRY (1998):  
Determination of third-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies  
J. Chromatogr. A **812**, 159-178
- PERRETEN, V., F. SCHWARZ, L. CRESTA, M. BOEGLIN, G. DASEN und M. TEUBER (1997):  
Antibiotic resistance spread in food  
Nature **389**, 801-802
- PETERSEN, B. H. und J. GRAHAM (1974):  
Immunologic cross-reactivity of cephalixin and penicillin  
J. Lab. Clin. Med. **83**, 860-870
- PETRAUSCH, R. (2004): Hrsg.  
Lila Liste *Remedia ad us. vet*-Lexikon der Tierarzneimittel  
19. Auflage, 26. Jahrgang, Delta Verlag GmbH, Berlin
- PETZ, L. D. (1971):  
Immunologic reactions of humans to cephalosporins  
Postgrad. Med. J. **47 (Suppl.)**, 64-69

PETZ, L. D. (1978):

Immunologic cross-reactivity between penicillins and cephalosporins: a review  
J. Infect. Dis. **137 (Suppl.)**, 74-79

PETZ, M. (1993):

Tierarzneimittel-Rückstände in Lebensmitteln – Ein Überblick -  
Lebensmittelchemie **47**, 26-31

PETZ, M. (2001):

Tandem-MS, Biosensoren und weitere analytische Trends sowie jüngste Erkenntnisse bei  
Tierarzneimittelrückständen  
Lebensmittelchemie **55**, 1-5

PHAM, N. H. und B. A. BALDO (1996):

$\beta$ -Lactam drug allergens: fine structural recognition patterns of cephalosporin-reactive IgE  
antibodies  
J. Mol. Recognit. **9**, 287-296

PHARMACIA & UPJOHN COMPANY (1998):

Excenel<sup>®</sup> Sterile Suspension (ceftiofur hydrochloride injection)  
For the treatment of bovine respiratory disease (BRD) associated with *Pasteurella multocida*,  
*P. haemolytica*, and *Haemophilus somnus* and for the treatment of acute bovine interdigital  
necrobacillosis (foot rot) associated with *Fusobacterium necrophorum* and  
*Bacterioides melaninogenicus*  
Freedom of information summary, Supplement to NADA 140-890  
Homepage Pharmacia 2003 ; www.PharmaciaAH.com

PHARMACIA UPJOHN GmbH, Erlangen (2000):

Excenel<sup>®</sup> RTU  
Gebrauchsinformation, Stand 2000

PHARMACIA UPJOHN GmbH, Erlangen (2003):

Akute Metritis: Neues Anwendungsgebiet für Excenel<sup>®</sup> RTU  
Dtsch. Tierärztebl. **6**, 676

PIDDOCK, L. J. V., R. N. WALTERS, Y.-F. JIN, H. L. TURNER, D. M. GASCOYNE-BINZI  
und P. M. HAWKEY (1997):

Prevalence and mechanism of resistance to „third-generation“ cephalosporins in clinically relevant  
isolates of *Enterobacteriaceae* from 43 hospitals in the UK, 1990-1991  
J. Antimicrob. Chemother. **39**, 177-187

PIKAL, M. J., A. L. LUKES und J. E. LANG (1977):

Thermal decomposition of amorphous  $\beta$ -lactam antibacterials  
J. Pharm. Sci. **66**, 1312-1316

- PITOUT, J. D. D., C. C. SANDERS und E. SANDERS Jr. (1997a):  
Antimicrobial resistance with focus on  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacilli  
Am. J. Med. **103**, 51-59
- PITOUT, J. D. D., E. S. MOLAND, C. C. SANDERS, K. S. THOMSON und  
S. R. FITZSIMMONS (1997b):  
 $\beta$ -lactamases and detection of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacter* spp.  
Antimicrob. Agents Chemother. **41**, 35-39
- PORSTMANN, T. und S. T. KIESSIG (1992):  
Enzyme immunoassay techniques  
An overview  
J. Immunol. Methods **150**, 5-21
- POSPÍŠILOVÁ, B. und J. KUBEŠ (1988):  
Beitrag zur merkurimetrischen Bestimmung der Cephalosporin-Antibiotika  
Pharmazie **43**, 246-248
- PRESCOTT, J. F., J. D. BAGGOT, und R. D. WALKER (2000):  
Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins  
Beta-lactam Antibiotics: Cephalosporins and Cephameycins  
Other Beta-lactam Antibiotics: Beta-lactamase Inhibitors, Carbapenems, and Monobactams  
In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3rd edition, Kap. 6, 7, 8, 105-176  
Iowa State University Press, Ames
- QUIN, J. D. (1989):  
The nephrotoxicity of cephalosporins  
Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev. **8**, 63-72
- RANKIN, G. O. und C. H. SUTHERLAND (1989):  
Nephrotoxicity of aminoglycosides and cephalosporins in combination  
Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev. **8**, 73-88
- RICHTER, E. D. (1993):  
Biosensors: applications for dairy food industry  
J. Dairy Sci. **76**, 3114-3117
- RISCO, C. A. und J. HERNANDEZ (2003):  
Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and  
reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes  
Theriogenology **60**, 47-58

- RITTENBURG, J. H. (1989):  
Fundamentals of immunoassays  
in: RITTENBURG, J. H.: Development and application of immunoassay for food analysis,  
Kap. 2, 29-58  
Elsevier Applied Science, London
- RITTER, L., G. KIRBY und C. CERNIGLIA (1996):  
Ceftiofur  
WHO-Food Additives Series **36**, 59-84
- RIVIERE, J. E. (1992):  
Practical aspects of the pharmacology of antimicrobial drug residues in food animals  
Agri-Practice **13**, 11-16
- ROBB, E. J., F. M. KAUSCHE, S. A. BROWN und S. T. CHESTER (1997a):  
Pharmacokinetic comparison of ceftiofur hydrochloride (EXCENEL<sup>®</sup> RTU Sterile Suspension,  
CH-SS) with ceftiofur sodium (NAXEL<sup>®</sup>/EXCENEL<sup>®</sup> Sterile Powder, CS-SP) administered to  
cattle  
J. vet. Pharmacol. Therap. **20 (Suppl. 1)**, 51-52
- ROBB E. J., M. PAYNE und S. A. BROWN (1997b):  
Session 7: Regulatory matters  
Tissue residues of desfuroylceftiofur-related metabolites and slaughterhouse screening tests results  
after intramuscular administration of ceftiofur sodium (NAXEL<sup>®</sup>/EXCENEL<sup>®</sup> sterile powder) to  
lactating dairy cattle  
J. vet. Pharmacol. Therap. **20 (Suppl. 1)**, 294-295
- ROBERSON, J. R. (2003):  
Establishing treatment protocols for clinical mastitis  
Vet. Clin. Food Anim. **19**, 223-234
- ROHNER, P., M. SCHÄLLIBAUM und J. NICOLET (1985):  
Detection of penicillin G and its benzylpenicilloyl (BPO)-derivates in cow milk and serum by  
means of an ELISA  
J. Food Prot. **48**, 59-62
- ROLINSON, G. N. (1979):  
6-APA and the development of the  $\beta$ -lactam antibiotics  
J. Antimicrob. Chemother. **5**, 7-14
- ROLINSON, G. N. (1998):  
Forty years of  $\beta$ -lactam research  
J. Antimicrob. Chemother. **41**, 589-603

ROMANO, A., D. QUARATINO, I. AIMONE-GASTIN, C. MAYORGA, G. PAPA, A. VENUTI, J. L. GUÉANT und M. BLANCA (1997):

Cephalosporin allergy: characterization of unique and cross-reacting cephalosporin antigens  
Int. J. Immunopathol. Pharmacol. **10**, 187-191

ROMANO, A., C. MAYORGA, M. J. TORRES, M. C. ARTESANI, R. SUAUA, F. SÁNCHEZ, E. PÉREZ, A. VENUTI und M. BLANCA (2000a):

Immediate allergic reactions to cephalosporins: cross-reactivity and selective responses  
J. Allergy Clin. Immunol. **106**, 1177-1183

ROMANO, A., M. J. TORRES, M. DI FONSO, L. LEYVA, M. ANDRIOLO, R. PETTINATO und M. BLANCA (2000b):

Delayed hypersensitivity to cefazolin: report on a case involving lymphocyte transformation studies with different cephalosporins  
Ann. Allergy Asthma Immunol. **87**, 238-240

ROMANO, A., R.-M. GUÉANT-RODRIGUEZ, M. VIOLA, R. PETTINATO und J.-L. GUÉANT (2004):

Cross-reactivity and tolerability of cephalosporins in patients with immediate hypersensitivity to penicillins  
Ann. Intern. Med. **141**, 16-22

ROSE, B. G., C. KAMPS-HOLTZAPPLE und L. H. STANKER (1995):

Competitive indirect ELISA for ceftiofur sodium and the effect of different immunizing and coating antigen conjugates  
Bioconjugate Chem. **6**, 529-535

ROSE, B. G., S. A. BUCKLEY, C. KAMPS-HOLTZAPPLE, R. C. BEIER und L. H. STANKER (1996a):

Molecular modeling studies of ceftiofur  
A tool for hapten design and monoclonal antibody production  
In: BEIER, R. C. und L. H. STANKER (Hrsg.)  
ACS Symposium Series 621, Immunoassays for residue analysis, Food Safety, 82-98  
American Chemical Society

ROSE, B. G., S. A. BUCKLEY, C. KAMPS-HOLTZAPPLE, R. C. BEIER und L. H. STANKER (1996b):

Ceftiofur sodium: monoclonal antibody development and cross-reactivity studies with structurally related cephalosporins  
J. Agric. Food Chem. **44**, 622-627.

ROSSITTO, P. V., L. RUIZ, Y. KIKUCHI, K. GLENN, K. LUIZ, J. L. WATTS und J. S. CULLOR (2002):

Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies  
J. Dairy Sci. **85**, 132-138

- ROUAN, M. C. (1985):  
Antibiotic monitoring in body fluids  
J. Chromatogr. **340**, 361-400
- ROUAN, M. C., F. ABADIE, A. LECLERC und F. JUGE (1983):  
Systematic approach to the determination of cephalosporins in biological fluids by reversed-phase liquid chromatography  
J. Chromatogr. **275**, 133-144
- RUSSELL, P. (1997):  
Antibiotic detection reviewed  
Milk Industrial International **99**, 16-19
- RUSSELL, A. S. und M. H. LESSOF (1971):  
Hypersensitivity to drugs  
Clinical Allergy **1**, 179-187
- SABATH, L. D., M. JAGO und E. P. ABRAHAM (1965):  
Cephalosporinase and penicillinase activities of a  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*  
Biochem. J. **96**, 739-752
- SAI, Y., I. TAMAI, H. SUMIKAWA, K. HAYASHI, T. NAKANISHI, O. AMANO, M. NUMATA, S. ISEKI und A. TSUJI (1996):  
Immunolocalization and pharmacological relevance of oligopeptide transporter PepT1 in intestinal absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics  
FEBS Letters, **392**, 25-29
- SALMON, S. A. und E. J. SCHMITT (2001):  
Minimum inhibitory concentration determinations for ceftiofur against *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from cases of acute puerperal metritis in cows  
Second International Symposium on Mastitis and Milk Quality, National Mastitis Council and American Association of Bovine Practitioners, September 2001;  
[www.100daycontract.com](http://www.100daycontract.com)
- SALMON, S. A., J. L. WATTS, C. A. CASE, L. J. HOFFMANN, H. C. WEGENER und R. J. YANCEY Jr. (1995):  
Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark  
J. Clin. Microbiol. **33**, 2435-2444
- SALMON, S. A., J. L. WATTS und R. J. YANCEY Jr. (1996):  
In vitro activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance  
J. Vet. Diagn. Invest. **8**, 332-336

SALMON, S. A., J. L. WATTS, F. M. AARESTRUP, J. W. PANKEY und R. J. YANCEY Jr. (1998):

Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark

J. Dairy Sci. **81**, 570-578

SALTER, R. S., D. LEGG, N. OSSANNA, C. BOYER, J. SCHEEMAKER, R. MARKOVSKY und S. J. SAUL (2001):

Charm safe-level  $\beta$ -lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephapirin, and penicillin G in raw commingled milk

J. AOAC Int. **84**, 29-36.

SAMARAJEEWA, U., C. I. WEI, T. S. HUANG, M. R. MARSHALL (1990):

Application of immunoassay in the food industry

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **29**, 403-434

SAXON, A., G. N. BEALL, A. S. ROHR und D. C. ADELMAN (1987):

Immediate hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics

Ann. Intern. Med. **107**, 204-215

SCANNELLA, D., P. NEAVES, K. KEEDY und C. BELL (1997):

An evaluation of the Delvo X-Press  $\beta$ L test for detecting  $\beta$ -lactams in ex-farm raw milks

Int. Dairy J. **7**, 93-96

SCHADEWINKEL-SCHERKL, A.-M. und R. SCHERKL (1995):

Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis

$\beta$ -Lactam-Antibiotika, 2.2. Cephalosporine, 1. Auflage, Kap. 2, 35-42

Gustav-Fischer Verlag, Jena u.a.

SCHÄLLIBAUM, M. (1986a):

Problematik der Antibiotika- und Desinfektionsmittelrückstände in der Milch im Zusammenhang mit Mastitistherapie und -prophylaxe

Kontamination der Milch mit Antibiotikarückständen – Situationsanalyse Schweiz

Dtsch. Molkerei-Ztg. **107**, 784-786

SCHÄLLIBAUM, M. (1986b):

Nachweis von Antibiotikarückständen in Milch mit dem Charm-Test

Dtsch. Molkerei.Ztg. **107**, 787-788

SCHÄLLIBAUM, M. (1989):

Antibiotikatherapie und Rückstände in der Ablieferungsmilch

Swiss Food **11**, 7-9

SCHANCK, A., B. COENE, J. M. DEREPPE und M. VAN MEERSSCHE (1983):

Substituent effect on chemical reactivity of cephalosporins studied by kinetic and  $^{13}\text{C}$  NMR

Bull. Soc. Chim. Belg. **92**, 81-82

- SCHEIDT, J., H. SCHACH und H. NEUSSEL (1972):  
Klinische Prüfung von Cefalexin bei chronischen Harnwegsinfektionen  
Dtsch. Med. Wochenschr. **97**, 1860-1864
- SCHENCK, F. J. und P. S. CALLERY (1998):  
Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk  
J. Chromatogr. A **812**, 99-109
- SCHERMERHORN, P. G., P.-S. CHU und M. A. NGOH (1998):  
Determination of cephapirin and ceftiofur residues in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection  
J. AOAC Int. **81**, 973-977
- SCHITO, G. C., A. PESCE und E. A. DEBBIA (1994):  
Stability in the presence of widespread  $\beta$ -lactamases  
A prerequisite for the antibacterial activity of  $\beta$ -lactam drugs  
Drugs **47 (Suppl. 3)**, 1-8; discussion 8-9
- SCHITO, G. C., A. GEORGOPOULOS und J. PRIETO (2002):  
Antibacterial activity of oral antibiotics against community-acquired respiratory pathogens from three European countries  
J. Antimicrob. Chemother. **50 (Suppl.)**, 7-11
- SCHLIEPHAKE, A. (1998):  
A comparative study of a newly developed agar-diffusion test and the Brilliant-Black-Reduction test in conjunction with an ELISA-reader to measure antibiotic residues in milk  
Milchwiss. **53**, 88-90
- SCHMITT, E. J., P.L.A.M. VOS, H. OKKER, P. SCHERPENISSE, A. A. BERGWERFF und F. H. JONKER (2000)  
Concentration of potentially active ceftiofur residues in plasma, uterine tissues and uterine secretions after postpartum administration of ceftiofur hydrochloride in lactating dairy cows  
Pharmacia Animal Health Study Report, October 2000, Kalamazoo, MI 49001;  
[www.100daycontract.com](http://www.100daycontract.com)
- SCHMITZ, F.-J., S. MAYER, M. BOOS, J. VERHOEF und A. C. FLUIT (2001):  
Resistenzmechanismen und In-vitro-Aktivitäten verschiedener Antibiotika bei *Streptococcus-pneumoniae*-Isolaten aus europäischen Universitätskliniken;  
Chemotherapie Journal **10**, 203-212
- SCHNAPPINGER, P. (1992):  
Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Streptomycin  
Diss. med. vet., München

SCHNAPPINGER, P., E. SCHNEIDER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1996):  
Rapid detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by enzyme-linked immunofiltration assay  
Food Agric. Immunol. **8**, 269-272

SCHNEIDER, E. (1991):  
Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Teststreifen-Verfahren zum Nachweis von niedermolekularen Rückständen (Mykotoxine, Chloramphenicol)  
Diss. med. vet., München

SCHNEIDER, E., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1988):  
ELISA-Teststreifenverfahren zum Nachweis von Mykotoxinen und pharmakologisch wirksamen Substanzen in der Milch  
29. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in Garmisch-Partenkirchen, 328-331

SCHNEIDER, E., P. SCHNAPPINGER, R. DIETRICH, E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1994):  
Schnellnachweise von Antibiotika- und Sulfonamidrückständen in Milch unter Berücksichtigung von technologischen Störgrenzen und Höchstmengen  
Welt der Milch **48**, 3-7

SCHNEIERSON, S. S., E. PERLMAN und R. SHORE (1964):  
Cephalothin antigenicity and cross reactivity with penicillin G  
Clin. Med. **71**, 1933-1937

SCHOLZ, H. (2001):  
Gruppeneinteilung der Oralcephalosporine  
Stellungnahme auf Anforderung der Schriftleitung  
Chemotherapie Journal **10** Jhrg Heft 4, 153-154

SCHOLZ, H., K. G. NABER und DIE EXPERTENGRUPPE DER PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE e.V. (PEG) (1999/2000):  
Einteilung der Oralcephalosporine  
Chemotherapie Journal **8**, 227-229 (1999); Med. Monatsschrift Pharm. **23**, 2-5 (2000)

SCHÜGERL, K. und G. SEIDEL (1998):  
Monitoring of the concentration of  $\beta$ -lactam antibiotics and their precursors in complex cultivation media by high-performance liquid chromatography  
J. Chromatogr. A **812**, 179-189

SCHWARTZ, M. A. und F. H. BUCKWALTER (1962):  
Pharmaceutics of penicillin  
J. Pharm. Sci. **51**, 1119-1128

- SCHWARZ, S. und E. CHASLUS-DANCLA (2001):  
Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance  
*Vet. Res.* **32**, 201-225
- SCHWARZ, S. und C. WERCKENTHIN (2001):  
Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion  
*Chemotherapie Journal* **10**, 197-202
- SEYMOUR, E. H., G. M. JONES und M. L. MCGILLIARD (1988a):  
Comparisons of on-farm screening tests for detection of antibiotic residues  
*J. Dairy Sci.* **71**, 539-544
- SEYMOUR, E. H., G. M. JONES und M. L. MCGILLIARD (1988b):  
Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle  
*J. Dairy Sci.* **71**, 2292-2296
- SHAH, P. M. (2001):  
Gruppeneinteilung der Oralcephalosporine  
*Chemotherapie Journal* **10**, 148-152
- SHAIKH, B. und W. A. MOATS (1993):  
Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin  
*J. Chromatogr.* **643**, 369-378
- SHELDON, I. M., M. BUSHNELL, J. MONTGOMERY und A. N. RYCROFT (2004):  
Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle  
*Vet. Rec.* **155**, 383-387
- SHIHO, O. und K. TSUCHIYA (1981a):  
IgE antibodies for penicillins and cephalosporins in rats. I  
Characteristics of the IgE antibodies for penicillins and cephalosporins in rats  
*J. Antibiot. (Tokyo)* **34**, 72-78
- SHIHO, O. und K. TSUCHIYA (1981b):  
IgE antibodies for penicillins and cephalosporins in rats. III  
Antigenic specificity of rat anti-cephalosporin Ova IgE sera  
*J. Antibiot. (Tokyo)* **34**, 84-89
- SHIHO, O., Y. NAKAGAWA und K. TSUCHIYA (1981):  
IgE antibodies for penicillins and Cephalosporins in rats. II  
Antigenic specificity of rat anti-penicillin Ova IgE sera  
*J. Antibiot. (Tokyo)* **34**, 79-83

- SILLEY, P. und G. BREWSTER (1988):  
Kill kinetics of the cephalosporin antibiotics cephalixin and cefuroxime against bacteria of veterinary importance  
Vet. Rec. **123**, 343-345
- SISCHO, W. M. (1996):  
Symposium: drug residue avoidance: the issue of testing  
Quality milk and tests for antibiotic residues  
J. Dairy Sci. **79**, 1065-1073
- SKOOG, S. M., T. C. SMYRK und J. A. TALWALKAR (2004):  
Cephalexin-induced cholestatic hepatitis  
J. Clin. Gastroenterol. **38**, 833
- SMITH, C. J. (1989):  
Evolution of the immunoassay  
in: RITTENBURG, J. H.: Development and application of immunoassay for food analysis,  
Kap. 1, 3-27  
Elsevier Applied Science, London
- SMITH, J. W., J. E. JOHNSON und L. E. CLUFF (1966):  
Studies on the epidemiology of adverse drug reactions  
II. An evaluation of penicillin allergy  
N. Engl. J. Med. **274**, 998-1002
- SMITH, B., S. C. WARREN, G. G. F. NEWTON und E. P. ABRAHAM (1967):  
Biosynthesis of penicillin N and cephalosporin C  
Antibiotic production and other features of the metabolism of a *Cephalosporium* sp.  
Biochem. J. **103**, 877-890
- SMITH, B. I., G. A. DONOVAN, C. RISCO, R. LITTELL, C. YOUNG, L. H. STANKER und J. ELLIOTT (1998):  
Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis  
J. Dairy Sci. **81**, 1555-1562
- SMITH, G. W., R. GEHRING, J. E. RIVIERE, J. L. YEATTS und R. E. BAYNES (2004):  
Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **224**, 1827-1830
- SMYTH, W. F. (2003):  
Electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected drugs and their metabolites  
Anal. Chim. Acta **492**, 1-16

SNIPPE, N., N. C. VAN DE MERBEL, F. P. M. RUITER, O. M. STEIJGER, H. LINGEMAN und U. A. T. BRINKMAN (1994):

Automated column liquid chromatographic determination of amoxicillin and cefadroxil in bovine serum and muscle tissue using on-line dialysis for sample preparation

J. Chromatogr. B **662**, 61-70

SOBACK, S., G. ZIV, B. KURTZ und R. PAZ (1987):

Clinical pharmacokinetics of five oral cephalosporins in calves

Res. Vet. Sci. **43**, 166-172

SOBACK, S., G. ZIV, A. BOR und M. SHAPIRA (1988):

Pharmacokinetics of cephalexin glycinate in lactating cows and ewes

Zentralbl. Veterinärmed. A/J. Vet. Med. A **35**, 755-760

SOBACK, S., G. ZIV, M. WINKLER und A. SARAN (1989):

Pharmacokinetics of ceftiofur administered intravenously and intramuscularly to lactating cows

Isr. J. Vet. Med. **45**, 118-123

SOBACK, S., S. BRIGHT und M. PAAPE (1991):

Disposition kinetics of ceftiofur in lactating cows

Acta Vet. Scand. **Supp 87**, 93-95

SØRENSEN, L. K., B. M. RASMUSSEN, J. O. BOISON und L. KENG (1997):

Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method

J. Chromatogr. B **694**, 383-391

SØRENSEN, L. K. und L. K. SNOR (2000):

Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. A **882**, 145-151

SOLBERG, C. O., A. SCHREINER und A. DIGRANES (1972):

Cephalexin therapy of lower respiratory tract, soft tissue and bone infections

Scand. J. Infect. Dis. **4**, 241-243

SPEIGHT, T. M., R. N. BROGDEN und G. S. AVERY (1972):

Cephalexin: a review of its antibacterial, pharmacological and therapeutic properties

Drugs **3**, 9-78

SPINKS, C. A. (2000):

Broad-specificity immunoassay of low molecular weight food contaminants: new paths to Utopia!

Trends Food Sci. Tech. **11**, 210-217

SPYKER, D. A., B. L. THOMAS, M. A. SANDE und W. K. BOLTON (1978):

Pharmacokinetics of cefaclor and cephalexin: dosage nomograms for impaired renal function

Antimicrob. Agents Chemother. **14**, 172-177

STAHLMANN, R. und H. LODE (2001):

Antibiotika und Chemotherapeutika

In: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN und K. STARKE:  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8.Auflage, Kap. 32, 791 -828  
Urban & Fischer Verlag, München, u.a.

STANEK, C. und J. KOFLER (1998):

Zum Einsatz von Na-Ceftiofur in der kombinierten Therapie von komplizierten  
Klauenerkrankungen beim Rind

Tierärztl. Prax. (G) **26**, 314-317

STANKER, L. H. und R. C. BEIER (1996):

Introduction to immunoassays for residue analysis

In: BEIER, R. C. und L. H. STANKER (Hrsg.)

ACS Symposium Series 621, Immunoassays for residue analysis, Food Safety, 2-16  
American Chemical Society

STANKER, L. H., S. A. BUCKLEY, M. T. MULDOON und R. C. BEIER (1996):

Application of an immunoassay for the analysis of ceftiofur in bovine tissue and fluids

Abstracts of Papers of the American Chemical Society **212**, 86-AGRO Part 1

STANKER, L. H., S. BUCKLEY, M. MULDOON, W. A. MOATS und C. BRASWELL (1998):

A monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of ceftiofur in milk

Food Agric. Immunol. **10**, 121-131

STEAD, S., M. SHARMAN, J. A. TARBIN, E. GIBSON, S. RICHMOND, J. STARK und  
E. GEIJP (2004):

Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of  
antimicrobial residues in animal food products

Food Addit. Contam. **21**, 216-221

STERNESJÖ, A. und G. JOHNSON (1995):

Analysis of beta-lactam antibiotic residues by an enzyme-linked fluorescent immunoassay

Int. Dairy Fed. Spec. Issue **9505**, 264-265

STERNESJÖ, A. und G. JOHNSON (1998):

A novel rapid enzyme immunoassay (Fluorophos BetaScreen) for detection of  $\beta$ -lactam residues in  
ex-farm raw milk

J. Food Prot. **61**, 808-811

STRASSER, A. (2003):

Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch –  
Herstellung der immunchemischen Komponenten

Diss. med. vet., München

STRASSER, A., E. USLEBER, R. DIETRICH, E. SCHNEIDER, C. BÜRK und E. MÄRTLBAUER (2000):

Ein verbesserter Enzymimmunttest zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen in Milch auf MRL-Niveau

In: 41. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 478-483

STRASSER, A., E. USLEBER, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH, C. BÜRK und E. MÄRTLBAUER (2003a):

Improved enzyme immunoassay for group-specific detection of penicillins in milk

Food Agric. Immunol. **15**, 135-143

STRASSER, A., R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, B. KNECHT, M. WELLER und R. NIESSNER (2003b):

Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antiinfektiva in Milch

In: 44. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 245-249

STRAUB, R. F. und R. D. VOYKSNER (1993):

Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephalixin by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry

J. Chromatogr. **647**, 167-181

STRAUB, R. F., M. LINDER und R. D. VOYKSNER (1994):

Determination of  $\beta$ -lactam residues in milk using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry

Anal. Chem. **66**, 3651-3658

SUHREN, G. (1996):

Untersuchungen zum Einfluß von Rückständen von antimikrobiell wirksamen Substanzen in Milch auf kommerziell eingesetzte Starterkulturen in Modellversuchen

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **48**, 131-149

SUHREN, G. (2002a):

Antibiotisch wirksame Substanzen in der Milch

Bedeutung, rechtliche Aspekte und Nachweis

Dtsch. Molkerei-Ztg. **123**, 224-231

SUHREN, G. (2002b):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch – rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **54**, 35-71

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1987a):

Entwicklungen zum Antibiotika-Nachweis in Milch

Dtsch. Molkerei-Ztg. **108**, 1566-1570

- SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1987b):  
Detection of antibiotics in milk with a modified microbial receptor assay (Charm test II)  
Milchwiss. **42**, 493-496
- SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1990):  
Zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch mit Cite-Test, Agardiffusionsverfahren und mikrobiellem Rezeptortest  
Dtsch. Molkerei-Ztg. **111**, 784-788
- SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1996):  
Detection of inhibitors in milk by microbial tests – a review  
Nahrung **40**, 1-7
- SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998a):  
Neue Tests – neue Aspekte  
Nachweis von  $\beta$ -Laktamantibiotikarückständen in Milch – Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest  
Dtsch. Molkerei-Ztg. **119**, 674-681
- SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998b):  
Screening-Verfahren zum Nachweis von  $\beta$ -Laktamantibiotikarückständen in Milch  
In: 39. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 584-589
- SUHREN, G. und J. REICHMUTH (2002):  
Messbarkeit und Entwicklung der hygienischen Wertigkeit des Rohstoffes Milch  
Dtsch. Milchwirtschaft **53**, 772-775
- SUHREN, G., A. HOFFMEISTER, J. REICHMUTH und W. HEESCHEN (1990):  
Incidence of inhibitory substances in milk for consumption from various European countries  
Milchwiss. **45**, 485-490
- SUHREN, G., P. HAMMER und W. HEESCHEN (1994):  
Hemmstoffe, Antibiotika und Sulfonamide  
Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **46**, 237-248
- SUHREN, G. J. REICHMUTH und H.G. WALTE (1996a):  
Detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk by the Penzym-test  
Milchwiss. **51**, 269-273
- SUHREN, G., H. G. WALTE und W. HEESCHEN (1996b):  
Zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Rückstände in Milch auf der Tankwagenebene  
In: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 315-323

- SUHREN, G., R. BEUKERS und J. REICHMUTH (1998):  
Beschreibung von Kriterien zur Beurteilung mikrobiologischer Hemmstofftests  
Dtsch. Milchwirtschaft **49**, 100-104
- SULLIVAN, H. R., R. E. BILLINGS und R. E. MCMAHON (1969):  
Metabolism of cephalixin-<sup>14</sup>C\* in mice and in rats  
J. Antibiot. (Tokyo) **22**, 195-200
- SULLIVAN, T. J., H. J. WEDNER, G. S. SHATZ, L. D. YECIES und C. W. PARKER (1981):  
Skin testing to detect penicillin allergy  
J. Allergy Clin. Immunol. **68**, 171-180
- SUNDLOF, S. F., J. B. KANEENE und R. A. MILLER (1995):  
National survey on veterinarian-initiated drug use in lactating dairy cows  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **207**, 347-352
- SUNKARA, G., C. B. NAVARRE und U. B. KOMPELLA (1999):  
Influence of pH and temperature on kinetics of ceftiofur degradation in aqueous solutions  
J. Pharm. Pharmacol. **51**, 249-255
- SWEET, R. M. und L. F. DAHL (1970):  
Molecular architecture of the cephalosporins. Insights into biological activity based on structural investigations  
J. Am. Chem. Soc. **92:18**, 5489-5507
- SYKES, R. (2001):  
Penicillin: from discovery to product  
Bull. World Health Organ. **79**, 778-779
- TENCONI, S., L. DE FILIPPO, M. DA COL, A. M. GIOACCHINI und P. TRALDI (1999):  
Electrospray mass spectrometry in the structural characterization of cephalosporins  
J. Mass Spectrom. **34**, 268-275
- TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):  
Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in Milch – eine kurze Übersicht  
Milchwiss. **22**, 761-771
- TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1975):  
Antibiotika, Hormone und Thyreostatika in Lebensmitteln tierischer Herkunft sowie ihre Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit  
Dtsch. Ärztebl. **72**, 344-350
- TEUBER, M. (2001):  
Veterinary use and antibiotic resistance  
Curr. Opinion Microbiol. **5**, 493-499

- THERRIEN, C. und R. C. LEVESQUE (2000):  
Molecular basis of antibiotic resistance and  $\beta$ -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions  
FEMS Microbiol. Rev. **24**, 251-262
- THOMA, K. (1993):  
Einführung in die Chemie und Galenik der oralen Cephalosporine  
FAC **12-1**, 3-8
- THOMSON, L. (2003):  
Cephalosporins-Veterinary-Systematic  
J. vet. Pharmacol Therap. **26(s2)**, 51-70
- THORNSBERRY, C. und Y. C. YEE (1996):  
Comparative activity of eight antimicrobial agents against clinical bacterial isolates from the United States, measured by two methods  
Am. J. Med. **100 (Suppl. 6A)**, 26-38
- TOLLEFSON, L. und M. A. MILLER (2000):  
Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact  
J. AOAC Int. **83**, 245-254
- TROLLDENIER, H. (1996):  
Resistenzentwicklungen von Infektionserregern landwirtschaftlicher Nutztiere in Deutschland (1990-1994) – ein Überblick  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **103**, 256-260
- TROLLDENIER, H. (1999):  
Zur Resistenzproblematik in der Veterinärmedizin – Übersicht aus bundesweit erfaßten Daten  
Tierärztl. Prax. (G) **27**, 317-323
- TROLLDENIER, H. und A. ESCHER (1978):  
Beziehungen zwischen tierärztlicher Anwendung von Chemotherapeutika und hemmstofffreier Rohmilch  
Mh. Vet.-med. **33**, 421-425
- TSAI, T. H., L. C. HUNG, Y. L. CHANG, A. Y. C. SHUM und C. F. CHEN (2000):  
Simultaneous blood and brain sampling of cephalexin in the rat by microdialysis and microbe liquid chromatography: application to pharmacokinetics studies  
J. Chromatogr. B **740**, 203-209
- TSANG, W. Y., A. DHANDA, C. J. SCHOFIELD und M. I. PAGE (2004):  
Kinetics and mechanisms of hydrolysis and aminolysis of thioxocephalosporins  
J. Org. Chem. **69**, 339-344

TSUSHIMA, M., K. IWAMATSU, E. UMEMURA, T. KUDO, Y. SATO, S. SHIOKAWA, H. TAKIZAWA, Y. KANO, K. KOBAYASHI, T. IDA, A. TAMURA und K. ATSUMI (2000):  
CP6679, a new injectable cephalosporin  
Part 1: Synthesis and structure-activity relationships  
Bioorg. Med. Chem. **8**, 2781-2789

TUFT, L. (1975):  
Contact urticaria from cephalosporins  
Arch. Dermatol. **111**, 1609

TUNE, B. M. und C.-Y. HSU (1995):  
Toxicity of cephalosporins to fatty acid metabolism in rabbit renal cortical mitochondria  
Biochem. Pharmacol. **49**, 727-734

TUNE, B. M., C.-Y. HSU und D. FRAVERT (1996):  
Cephalosporin and carbacephem nephrotoxicity  
Roles of tubular cell uptake and acylating potential  
Biochem. Pharmacol. **51**, 557-561

TYCZKOWSKA, K. L., R. D. VOYKSNER und A. L. ARONSON (1991):  
Development of an analytical method for cephapirin and its metabolite in bovine milk and serum  
by liquid chromatography with UV-VIS detection and confirmation by thermospray mass  
spectrometry  
J. vet. Pharmacol. Therap. **14**, 51-60

TYCZKOWSKA, K. L., R. D. VOYKSNER, K. L. ANDERSON und A. L. ARONSON (1993):  
Determination of ceftiofur and its metabolite desfurioylceftiofur in bovine serum and milk by ion-  
paired liquid chromatography  
J. Chromatogr. **614**, 123-134

TYCZKOWSKA, K. L., R. D. VOYKSNER, R. F. STRAUB und A. L. ARONSON (1994):  
Simultaneous multiresidue analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk by liquid  
chromatography with ultraviolet detection and confirmation by electrospray mass spectrometry  
J. AOAC Int. **77**, 1122-1131

TYLER, J. W., J. S. CULLOR, R. J. ERSKINE, W. L. SMITH, J. DELLINGER und  
K. MCCLURE (1992):  
Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced  
mastitis  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **201**, 1378-1384

TYLER, J. W., D. C. RUFFIN und A. YU (1998):  
Probable ceftiofur-induced cutaneous drug reaction in a cow  
Can. Vet. J. **39**, 296-298

UNO, K. und F. YAMASAKU (1989):

Structural correlations with cross-reactivity of  $\beta$ -lactam antibiotics in delayed type hypersensitivity  
Cross-allergenicity in hypersensitivity to cepheems with a tetrazolyl group in the C-3 side chain  
J. Antimicrob. Chemother. **24**, 251-264

USLEBER, E., E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994a):

Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in  
Lebensmitteln tierischen Ursprungs – eine Übersicht  
Arch. Lebensmittelhyg. **45**, 32-35

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

Enzyme immunoassay for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk  
Analyst **119**, 2765-2768

USLEBER, E., S. LITZ und E. MÄRTLBAUER (1998):

Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics  
Food Agric. Immunol. **10**, 317-324

USLEBER, E., R. DIETRICH, A. STRASSER, K.-J. ZAADHOF und E. MÄRTLBAUER (2000):

Substanzdifferenzierung von betalaktam-Antibiotika in Hemmstoff-positiven Milchproben unter  
Verwendung von Rezeptor- und Enzymimmuntests

In: 41. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen  
Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 221-225

VALIO Ltd, Helsinki, Finnland (2004):

T101-Test for detecting antimicrobial residues in milk  
Detection level of T101-test and MRL-values  
Produktinformation email 2004 (Stand 2003)

VANDAMME, E. J. und J. P. VOETS (1972):

Separation and detection of degradation products of penicillins and cephalosporins by means of  
thin-layer chromatography  
J. Chromatogr. **71**, 141-148

VAN WEEMEN, B. K. und A. H. W. M. SCHUURS (1975):

The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the  
characteristics of estrogen enzyme-immunoassays  
Immunochemistry **12**, 667-670

VERHEIJEN, R., I. K. OSSWALD, R. DIETRICH und W. HAASNOOT (2000):

Development of a one step strip test for the detection of (dihydro)streptomycin residues in raw milk  
Food Agric. Immunol. **12**, 31-40

VERMEERSCH, H., G. VANDENBOSSCHE, J. P. REMON, W. SAMYN, K. VANDENDRIESSCHE, B. SUSTRONCK, E. MUYLLE und P. DEPREZ (1996):  
Pharmacokinetics of nebulized sodium ceftiofur in calves  
J. vet. Pharmacol Therap. **19**, 152-154

VIRBAC Tiergesundheit GmbH, Bad Oldesloe (2003):  
Rilexine<sup>®</sup> 200 LC  
Produktinformation

VOYKSNER, R. D. und H. LEE (1999):  
Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry  
Rapid Commun. Mass Spectrom. **13**, 1427-1437

WALKER, S. H. und E. P. GONZALES (1971):  
Cephalexin: effective oral antibiotic for coccal infections  
Md. State Med. J. **20**, 63-65

WALSER, K. (1979):  
Ausscheidungs- und Rückstandsprobleme nach therapeutischer Anwendung von Antibiotika und Sulfonamiden beim Rind  
Tierärztl. Umschau **34**, 232-242

WALTE, H.-G., G. SUHREN und J. REICHMUTH (1996):  
Nachweis von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in Milch mit mikrobiologischen und enzymatischen Tests  
In: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 337-342

WARD, W. R. (2001):  
Lameness in dairy cattle  
Ir. Vet. J. **54**, 129-139

WATTS, J. L. und S. A. SALMON (1997):  
Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce  $\beta$ -lactamase  
J. Dairy Sci. **80**, 788-791

WATTS, J. L., R. J. YANCEY Jr., S. A. SALMON und C. A. CASE (1994):  
A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America  
J. Clin. Microbiol. **32**, 725-731

WATTS, J. L., S. A. SALMON, R. J. YANCEY Jr., S. C. NICKERSON, L. J. WEAVER, C. HOLMBERG, J. W. PANKEY und L. K. FOX (1995):  
Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers  
J. Dairy Sci. **78**, 1637-1648

- WAXMAN, D. J. und J. L. STROMINGER (1983):  
 Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics  
 Ann. Rev. Biochem. **52**, 825-869
- WEBBER, J. A., E. M. VAN HEYNINGEN und R. T. VASILEFF (1969):  
 Chemistry of cephalosporin antibiotics  
 XVII. Functionalization of deacetcephalosporin. The conversion of penicillin into cephalosporin  
 J. Am. Chem. Soc. **91:20**, 5674-5675
- WEBBER, J. A., J. L. OTT und R. T. VASILEFF (1975):  
 Chemistry of cephalosporin antibiotics  
 28. Preparation and biological activity of 3-(substituted)vinyl cephalosporins  
 J. Am. Chem. Soc. **18**, 986-992
- WEISKOPF, S. und F. M. KAUSCHE (1995):  
 Ceftiofur (Excenel<sup>®</sup>) das erste Cephalosporin zur Injektion für die Therapie von bakteriellen  
 Atemwegserkrankungen  
 Prakt. Tierarzt **76**, 323-326
- WERBER, D. und T. BERGMANN (1998):  
 Modelluntersuchungen zum impedimetrischen Antiinfektivanachweis unter besonderer  
 Berücksichtigung der Milch  
 Arch. Lebensmittelhyg. **49**, 121-144
- WHITTEM, T., D. A. FREEMAN, D. HANLON und K. PARTON (1995):  
 The effects on the pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium in dairy cattle of simultaneous  
 intravenous acetylsalicylate (aspirin) or probenecid  
 J. vet Pharmacol. Therap. **18**, 61-67
- WHITTEM, T. und B. SLACEK (1996):  
 Contrast between the pharmacokinetics of two formulations of cephalexin after intramuscular  
 administration in cattle  
 N. Z. Vet. J. **44**, 145-147
- WICHER, K., R. E. REISMAN und C. E. ARBESMAN (1969):  
 Allergic reaction to penicillin present in milk  
 J. Am. Med. Assoc. **208**, 143-145
- WICHER, K. und R. E. REISMAN (1980):  
 Anaphylactic reaction to penicillin (or penicillin-like substance) in a soft drink  
 J. Allergy Clin. Immunol. **66**, 155-157
- WICKERN, G. M., W. A. NISH, A. S. BITNER und T. M. FREEMAN (1994):  
 Allergy to  $\beta$ -lactams: a survey of current practices  
 J. Allergy Clin. Immunol. **94**, 725-731

- WITTOWSKI, G (1999):  
Antibiotikaresistenz – Konsequenzen für die tierärztliche Praxis und Alternativen zum Antibiotikaeinsatz beim Rind  
Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Vortrag BPT-Kongress Nürnberg 18.11.99
- WONG, S. S. (1991):  
Chemistry of protein conjugation and cross-linking  
Kap. 2 Reactive groups of proteins and their modifying agents  
III. Functional groups of proteins  
B. Chemically introduced reactive groups, 23-25  
CRC Press, Inc., Boca Raton u.a.
- WOUTERS, I., S. HENDRICKX, E. ROETS, J. HOOGMARTENS und H. VANDERHAEGE (1984):  
Selectivity of reversed-phase packing materials in high-performance liquid chromatography of cephalosporins  
J. Chromatogr. **291**, 59-80
- WRIGHT, W. W. und L. C. HAROLD (1960):  
Antibiotic residues in milk  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **137**, 525-533
- WU, Z. J., W. B. GUO, Q. G. ZHANG, K. Y. NI und Y. S. LIN (1999):  
Studies on the simultaneous measurement of several cephalosporins by RP-HPLC (I)  
Se Pu (Chinese Journal of Chromatography) **17**, 518-521
- YAMAMOTO, H., T. TERASAWA, A. OHKI, F. SHIRAI, K. KAWABATA, K. SAKANE, S. MATSUMOTO, Y. MATSUMOTO und S. TAWARA (2000a):  
Orally active cephalosporins:  
Synthesis, structure-activity relationships and oral absorption of 3-[(*E*) and (*Z*)-2-substituted vinyl]-cephalosporins  
Bioorg. Med. Chem. **8**, 43-54
- YAMAMOTO, H., T. TERASAWA, A. NAKAMURA, K. KAWABATA, K. SAKANE, S. MATSUMOTO, Y. MATSUMOTO und S. TAWARA (2000b):  
Orally active cephalosporins. Part 2:  
Synthesis, structure-activity relationships and oral absorption of cephalosporins having a C-3 pyridyl side chain  
Bioorg. Med. Chem. **8**, 1159-1170
- YAMAMOTO, H., T. TERASAWA, A. NAKAMURA, K. KAWABATA, H. TAKASUGI, H. TANAKA, S. MATSUMOTO, Y. MATSUMOTO und S. TAWARA (2001):  
Orally active cephalosporins. Part 3:  
Synthesis, structure-activity relationships and oral absorption of novel C-3 heteroarylthio cephalosporins  
Bioorg. Med. Chem. **9**, 465-475

- YAMANA, T. und A. TSUJI (1976):  
Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanisms of degradation  
*J. Pharm. Sci.* **65**, 1563-1574
- YANCEY Jr., R. J., M. L. KINNEY, B. J. ROBERTS, K. R. GOODENOUGH, J. C. HAMEL und C. W. FORD (1987):  
Ceftiofur sodium, a broad spectrum cephalosporin: evaluation in vitro and in vivo in mice  
*Am. J. Vet. Res.* **48**, 1050-1053
- YU, A. B. C., C. H. NIGHTINGALE und D. R. FLANAGAN (1977):  
Rapid sensitive fluorometric analysis of cephalosporin antibiotics  
*J. Pharm. Sci.* **66**, 213-216
- YUN, E. K., A. J. PRINCE, J. E. MCMILLIN und L. E. WELCH (1998):  
High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins  
*J. Chromatogr. B* **712**, 145-152
- ZAADHOF, K.-J., E. MÄRTLBAUER, A. VORREITER und L. SCHWEITZER (1997):  
Zur Eignung kommerzieller mikrobiologischer Hemmstofftests als Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis  
*Arch. Lebensmittelhyg.* **48**, 127-132
- ZENG, S. S., S. HART, E. N. ESCOBAR und K. TESFAI (1998):  
Validation of antibiotic residue tests for dairy goats  
*J. Food Prot.* **61**, 344-349
- ZHAO, Z., B. A. BALDO und J. RIMMER (2002):  
 $\beta$ -lactam allergenic determinants: fine structural recognition of a cross-reacting determinant on benzylpenicillin and cephalothin  
*Clin. Exp. Allergy* **32**, 1644-1650
- ZHI, Z.-L., U. J. MEYER, J. W. VAN DEN BEDEM und M. MEUSEL (2001):  
Evaluation of an automated and integrated flow-through immunoanalysis system for the rapid determination of cephalexin in raw milk  
*Anal. Chim. Acta* **442**, 207-219
- ZHOU, C., J. F. BOUCHER, K. J. DAME, M. MOREIRA, R. GRAHAM, J. NANTEL, S. ZUIDHOF, L. ARFI, R. FLORES, G. NEUBAUER und J. OLSON (2001):  
Multilocation trial of ceftiofur for treatment of postpartum cows with fever  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **219**, 805-808

ZIV, G., J. SHANI und F. G. SULMAN (1973):

Pharmacokinetic evaluation of penicillin and cephalosporin derivatives in serum and milk of lactating cows and ewes

Am. J. Vet. Res. **34**, 1561-1565

ZOMER, E. und T. LIEU (1996):

Performance of a broad spectrum anti-microbial drug inhibition assay (AIM 96) in an inter-laboratory collaborative study in bulk raw milk

Milchwiss. **51**, 696-698

ZOMER, E., J. QUINTANA, S. SAUL und S. E. CHARM (1995):

LC-receptorgram: a method for identification and quantitation of  $\beta$ -lactams in milk by liquid chromatography with microbial receptor assay

J. AOAC Int. **78**, 1165-1172

ZOMER, E., J. QUINTANA, J. SCHEEMAKER, S. SAUL und S. E. CHARM (1996):

High-performance liquid chromatography-receptorgram: a comprehensive method for identification of veterinary drugs and their active metabolites

In: MOATS, W. A. und M. B. MEDINA (Hrsg.)

ACS Symposium Series 636, Veterinary Drug Residues, Food Safety, 149-160

American Chemical Society

ZWALD, A. G., P. L. RUEGG, J. B. KANEENE, L. D. WARNICK, S. J. WELLS, C. FOSSLER und L. W. HALBERT (2004):

Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms

J. Dairy Sci. **87**, 191-201

## **8.1 Zitierte Rechtsvorschriften**

Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts vom 1. September 2005 (BGBl I, 2618) in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch, Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, LFGB) vom 26. April 2006 (BGBl I, 945).

Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz AMG) vom 24. August 1976 (BGBl I, 2445, 2448), in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Dezember 1998 (BGBl I, 3586), unter Berücksichtigung der Bekanntmachung der Neufassung des Arzneimittelgesetzes vom 30. Juli 2004 (BGBl I, 2031), Stand: Änderungsverordnung vom 10. Februar 2005 (BGBl I, 234).

Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung (PharmStoffV) vom 3. August 1977 (BGBl I, 1479), Stand: Bekanntmachung der Neufassung vom 7. März 2005 (BGBl I, 730).

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 1990, L 224, 1), Stand: Änderungsverordnung (EG) Nr. 712/2005 der Kommission vom 11. Mai 2005 (ABl 2005, L 120, 3).

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung) vom 24. April 1995 (BGBl I, 544) in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Juli 2000 (BGBl I, 1178), Stand: Änderungsverordnung vom 12. November 2004 (BGBl I, 2794).

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güte-Verordnung) vom 9. Juli 1980 (BGBl I, 878), Stand: Änderungsverordnung vom 30. Oktober 2003 (BGBl I, 2170).

Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis (ABl 1992, L 268, 1), Stand: Richtlinie 2003/85/EG vom 29. September 2003 (ABl 2003, L 306, 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 2002, L 31, 1), Stand: Änderungsverordnung (EG) Nr. 1642/2003 vom 22. Juli 2003 des Parlaments und des Rates (ABl 2003, L 245, 4).

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene vom 29. April 2004 (ABl 2004, L 139, 1), Stand: Fassung der Berichtigung der Verordnung (ABl 2004, L 226, 3).

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (ABl 2004, L 139, 55), Stand: Fassung der Berichtigung der Verordnung (ABl 2004, L 226, 22).

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (ABl 2004, L 139, 206), Stand: Fassung der Berichtigung der Verordnung (ABl 2004, L 226, 83) und Änderungsverordnung (EG) 882/2004 vom 29. April 2004 (ABl 2004, L 165, 1).

Nationaler Rückstandskontrollplan in Folge der Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG (ABl 1996, L 125, 10), Stand: Verordnung (EG) 882/2004 vom 29. April 2004 (ABl 2004, L 165, 1), und Entscheidung 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probennahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen (ABl 1997, L 303, 12).

## 9

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABl = Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, Amtsblatt der Europäischen Union

Abs. = Absorption

7-ACS = 7-Aminocephalosporansäure

7-ADCA = 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid

A. dest. = *Aqua destillata*, destilliertes Wasser

ADI = acceptable daily intake, „annehmbare (orale) Tagesdosis“

AMG = Arzneimittelgesetz

AP = alkalische Phosphatase

6-APS = 6-Aminopenicillansäure

ASU = Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren

*B.* = *Bacillus*

B = antibiotikahaltiger bzw. antigenhaltiger Ansatz, Extinktionswert bei 450 nm

B0 = antibiotikafreier bzw. antigenfreier Ansatz, Extinktionswert bei 450 nm

BAFM = Bundesanstalt für Milchforschung

BbT = Bundesverband der beamteten Tierärzte

BGBI = Bundesgesetzblatt

BPO = durch alkalische Hydrolyse erzeugte Penicillin G Derivate, Benzylpenicilloyl

BRT = Brillantschwarz-Reduktionstest

BSA = bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin

c = Konzentration

C = 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid, Carbodiimid

[C] = Cefalexin bzw. Ceftiofur

CCRVDf = Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food

C<sub>av</sub> = average Ceftiofur, durchschnittliche Ceftiofurmenge

C<sub>nach 24h</sub> = gemessene Konzentration nach 24 Stunden

C<sub>max</sub> = gemessene Maximalkonzentration

d = Tag

DASP = Double Antibody Solid Phase, Doppelantikörpertechnik

DAZ = Deutsche Apotheker Zeitung

DC = Dünnschicht Chromatographie

DFA = Desfuroylceftiofur-Acetamid

DFC = Desfuroylceftiofur

DMSO = Dimethylsulfoxid

DTE = Dithioerythritol

DVG = Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.

*E.* = *Escherichia*

E = Extinktion

ED(P)C = 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid

EIA = Enzymimmunoassay

ELISA = Enzyme-linked-immuno-sorbent assay, Enzymimmunoassay

EMEA = The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Europäische Agentur für die Zulassungsprüfung von Arzneimitteln  
*et al.* = *et altera*, und andere  
 EU = Europäische Union  
 E(W)G = Europäische (Wirtschafts-)Gemeinschaft  
 FAC = Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie  
 FAO = Food and Agriculture Organization  
 FDA = Food and Drug Administration  
 FEDESA = European Federation for Animal Health  
 FIA = Fluoreszenzimmunoassay  
 FIIA = flow injection immunoanalysis  
*g* = Gravitation, Erdbeschleunigung  
*g* = Gramm  
 GA = Glutardialdehyd  
 GC = Gaschromatographie  
 GC/MS = Gaschromatographie-Massenspektrometrie  
 GDCH = Gesellschaft Deutscher Chemiker  
 GMBS = N-[( $\gamma$ -maleimido-butyl)oxy]sulfosuccinimid-Ester  
*H.* = *Haemophilus*  
*h* = Stunde(n)  
 HCl = Hydrochlorid  
 HPLC = high performance liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie  
 HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase  
 HVL = Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.  
 IDF = International Dairy Federation  
 Ig = Immunglobulin  
*i.m.* = intramuskulär  
 IU = international units, internationale Einheiten (Enzymaktivität)  
*i.v.* = intravenös  
*k.A.* = keine Angabe  
 Kan. = Kaninchen  
 KGW = Körpergewicht  
 KLH = keyhole limpet hemocyanin  
 KLH-SMCC = Maleimid-aktiviertes KLH  
 l = Liter  
 $\lambda$  = Lambda, Symbol für Wellenlänge  
 LC = liquid chromatography, Flüssigkeitschromatographie  
 LC-ES(P)-MS = liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie  
 LC/MS = liquid chromatography mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie

LC-MS/MS = liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie  
 LC-MS SIM = liquid chromatography-mass spectrometry selected ion monitoring, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie  
 LFGB = Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch, Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch  
 max = maximal  
 MBS = N-(*m*-maleimidobenzoyl)Succinimid  
 MIC = minimum inhibitory concentration, minimale Hemmkonzentration  
 MS = Massenspektrometrie  
 MS-BSA = Mercaptosuccinyl-bovine Serumalbumin  
 mg = Milligramm  
 µg = Mikrogramm  
 ml = Milliliter  
 µl = Mikroliter  
 mmol = millimol  
 min = Minuten  
 MPR = Milchprüfring  
 MRL(s) = Maximum Residue Limit(s), Rückstandshöchstmenge(n)  
 MRSA = Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme  
 n = Anzahl  
 Na = Natriumsalz  
 NaOH = Natronlauge  
 NAHMS = National Animal Health Monitoring System, nationales Überwachungsprogramm der Tiergesundheit  
 NARMS = National Antimicrobial Resistance Monitoring System, nationales Überwachungsprogramm der antimikrobiellen Resistenzentwicklung  
 NHS-Succinat = N-hydroxysuccinimid-Succinat  
 NOEL = no observed effect level; höchste Wirkstoffkonzentration, die keine substanzspezifischen Wirkungen mehr auslöst  
 NWG = Nachweisgrenze  
 ng = Nanogramm  
 nm = Nanometer  
 OVA-S = thioliertes Ovalbumin  
 P = Probe  
 + P = enzymatische Hydrolyse durch Penicillinase-Behandlung  
 PABA = Para-Amino-Benzoesäure  
 pg = Picogramm  
 PharmStoffV = Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung  
 PBP = Penicillin-bindende-Proteine  
 PBS = phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte-Kochsalzlösung, Phosphatpuffer  
 Pen G = Penicillin G

PEG = Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie  
R = Referenz  
RIA = Radioimmunoassay  
RT = Raumtemperatur  
*S.* = *Staphylococcus*  
s.c. = subcutan  
SMPB = Sulfosuccinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)-butyrat  
SPFIA = solid-phase fluorescence immunoassay, Festphasen- Fluoreszenzimmunoassay  
*Str.* = *Streptococcus*  
TLC = thin-layer chromatography, Dünnschicht Chromatographie  
 $T_{\max}$  = Zeitpunkt der gemessenen Maximalkonzentration  
TMB = Tetramethylbenzidin  
 $T_{1/2}$  = Halbwertszeit  
UV = Ultraviolett  
VK = Variationskoeffizient  
VO = Verordnung  
WHO = World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation



Tabelle 2.3: Publizierte Werte für die Konzentrationen von Cefiofur und/oder Metaboliten in Plasma und Gewebe nach verschiedenen Applikationsarten

<b>Präparat/Substanz</b>	<b>Tierart</b>	<b>Applikationsart</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Referenz</b>
Cefiofur-Na	Kälber	intramuskulär	1,0 mg/kg KGW	1
		intravenös	1,0 mg/kg KGW	
Cefiofur-Na	laktierende Rinder	intravenös	2,2 mg/kg KGW	2
		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW	
Naxel® (Cefiofur-Na)	Stiere	k.A.	1,1 mg/kg KGW	3
Cefiofur-Na	laktierende Rinder	intramuskulär	500 mg/Tier	4
			zweimalig (alle 24 h)	
Cefiofur-HCl		intramammär	100 mg/Tier	einmalig
Cefiofur-HCl		intramammär	200 mg/Tier	zweimalig (alle 24 h)
Cefiofur-Na und		intramuskulär und	500 mg/Tier	einmalig
Cefiofur-HCl		intramammär	100 mg/Tier	Kombination
Cefiofur *	Rinder u. Kälber	k.A.	k.A.	5
Cefiofur *	Kälber	k.A.	k.A.	
Cefiofur-Na	Kälber	intravenös oder intramuskulär	1 mg/kg KGW	6
Naxel® (Cefiofur-Na)	laktierende Rinder	intravenös	2 mg/kg KGW	7
			8 mg/kg KGW	
			16 mg/kg KGW	
Naxel®/Excenel® (Cefiofur-Na)	Kälber	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW	8
			4,4 mg/kg KGW	
			einmalig	viermalig (alle 24 h)
			einmalig	

Fortsetzung Tabelle 2.3:

<b>Präparat/Substanz</b>	<b>Tierart</b>	<b>Applikationsart</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Referenz</b>
Naxel® (Ceftiofur-Na)	gesunde laktierende Rinder	intravenös	3,0 mg/kg KGW dreimalig (alle 12 h)	9
	Mastitis-Rinder	intravenös	3,0 mg/kg KGW dreimalig (alle 12 h)	
Excenel® (Ceftiofur-Na)	k.A. vermtl. Rind	intramuskulär	1,0 mg/kg KGW einmalig	10
Ceftiofur-Na	Rinder	intravenös	2 mg/kg KGW einmalig	11
Naxel®/Excenel® (Ceftiofur-Na)	7 d alte Kälber	intravenös	2,2 mg/kg KGW einmalig	12
		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig	
Naxel®/Excenel® (Ceftiofur-Na)	1-9 Monate alte Kälber	intravenös	2,2 mg/kg KGW einmalig	
		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig	
Excenel® (Ceftiofur-Na)	Kälber	intravenös	1,0 mg/kg KGW einmalig	13
Naxel®/Excenel® (Ceftiofur-Na)	laktierende Rinder	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW fünfmalig (1xd)	14
		intramuskulär	1,0 mg/kg KGW fünfmalig (1xd)	
Naxel®/Excenel® (Ceftiofur-Na) + Rinder		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig in	15
Excenel® RTU (Ceftiofur-HCl)		subcutan	2,2 mg/kg KGW Kombination	
Naxel®/Excenel® (Ceftiofur-Na) + Rinder		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig in	
Excenel® RTU (Ceftiofur-HCl)		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW Kombination	
Ceftiofur-HCl	Fleischrinder	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig	16
Ceftiofur-Na		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig	
Ceftiofur-HCl	Hereford Stiere	subcutan	2,2 mg/kg KGW einmalig	
Ceftiofur-Na		subcutan	2,2 mg/kg KGW einmalig	
Ceftiofur *	Kälber	intramuskulär	1,1 mg/kg KGW fünfmalig (1xd)	17
Naxel®/Excenel® (Ceftiofur-Na)	Fleischrinder	intramuskulär	2,2 mg/kg KGW einmalig	18
		subcutan	2,2 mg/kg KGW einmalig	

Fortsetzung Tabelle 2.3:

<b>Präparat/Substanz</b>	<b>Tierart</b>	<b>Applikationsart</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Referenz</b>	
Ceftiofur *	laktierende Rinder	intramammär	125 mg/Viertel	zweimalig (alle 12 h)	19
		intramammär	125 mg/Viertel	zweimalig (alle 24 h)	
Ceftiofur-HCl	trächtige, trocken- stehende Rinder	intramammär	250 mg/Viertel	einmalig	
		intramammär	500 mg/Viertel	einmalig	
Ceftiofur-Na	Rinder	subcutan	2,2 mg/kg KGW	einmalig	20
Ceftiofur-Na		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW	einmalig	
Ceftiofur-HCl		subcutan	2,2 mg/kg KGW	einmalig	
Ceftiofur-HCl		intramuskulär	2,2 mg/kg KGW	einmalig	
Excenel® RTU (Ceftiofur-HCl)	laktierende Rinder	subcutan	1,0 mg/kg KGW	einmalig	21

Fortsetzung Tabelle 2.3:

gemessener Rückstand	gemessen in	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	C <sub>nach 24 h</sub>	T <sub>1/2</sub>	Referenz
DFC	Plasma	4,12 µg/ml 7,09 µg/ml	0,75 h 0,30 h	k.A. k.A.	9,65 h 8,63 h	1
Ceftiofur	Plasma	k.A.	k.A.	k.A.	217 min	2
Ceftiofur	Plasma	4,58 µg/ml	60 min	k.A.	212 min	
DFA	Plasma	7 µg/ml	1 h	k.A.	k.A.	3
Ceftiofur	Plasma	< NWG	k.A.	k.A.	k.A.	4
	Eutergewebe	< NWG	k.A.	k.A.	k.A.	
Ceftiofur	Plasma	0,01 - 0,4 µg/ml	8 h	k.A.	k.A.	
	Eutergewebe	0,01 - 0,1 µg/ml	6 h	k.A.	k.A.	
Ceftiofur	Plasma	0,01 - 0,4 µg/ml	zu allen Messzeitpunkten	k.A.	k.A.	
	Eutergewebe	0,8 µg/ml	6 h nach 2. Infusion	k.A.	k.A.	
Ceftiofur	Plasma	1,4 µg/ml	4 h	k.A.	k.A.	
	Eutergewebe	0,06 µg/ml	10 h	k.A.	k.A.	
Ceftiofur	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	9,65 h	5
DFA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	3,5 h	
DFA	Plasma	3,75 mg/l	1 h	k.A.	k.A.	6
Ceftiofur	Plasma	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	7
		k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
		< 100 ng/ml	k.A.	k.A.	k.A.	
Ceftiofur	Plasma	8,8 µg/ml	2 h	k.A.	3,56 h	8
		13,1 µg/ml		k.A.	k.A.	
Ceftiofur	Plasma	17,3 µg/ml	2 h	k.A.	k.A.	
		24,1 µg/ml		k.A.	k.A.	

Fortsetzung Tabelle 2.3:

<b>gemessener Rückstand</b>	<b>gemessen in</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>T<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>nach 24 h</sub></b>	<b>T<sub>1/2</sub></b>	<b>Referenz</b>
Ceftiofur	Plasma	0,7 µg/ml	k.A.	k.A.	k.A.	k.A. 9
Ceftiofur	Plasma	1,0 µg/ml	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
DFC	Plasma	4,12 mg/l	1 h	k.A.	k.A.	9,65 h 10
Ceftiofur-Äquivalente	Plasma	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	7,12 h 11
DFA	Plasma	10,6 µg/ml	0 - 0,33 h	k.A.	k.A.	15,6 h 12
		9,36 µg/ml	1 - 2 h	k.A.	k.A.	21,52 h
		12,9 - 16,9 µg/ml	0 - 1 h	k.A.	k.A.	5,24 - 14,3 h
		8,35 - 9,31 µg/ml	0,33 - 2 h	k.A.	k.A.	6,69 - 14,0 h
Ceftiofur	Plasma	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	3,2 h 13
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	11,4 µg/ml	1 - 2 h	0,662 µg/ml	k.A.	5,57 h 14
		5,44 µg/ml	1 - 2 h	0,410 µg/ml	k.A.	6,93 h
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	4,1 µg/ml	k.A.	k.A.	k.A.	k.A. 15
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	3,9 µg/ml	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	9,79 µg/ml	1 - 4 h	1,47 µg/ml	k.A.	13,3 h 16
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	15,3 µg/ml	0,33 - 2 h	1,16 µg/ml	k.A.	9,68 h
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	8,56 µg/ml	1 - 5 h	0,926 µg/ml	k.A.	11,5 h
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	14,4 µg/ml	0,67 - 3 h	0,860 µg/ml	k.A.	11,1 h
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	4,34 µg/ml	2,4 h	k.A.	k.A.	10 h 17
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	13,9 µg/ml	0,67 - 2,0 h	k.A.	k.A.	10,7 µg/ml 18
		13,6 µg/ml	0,67 - 3,0 h	k.A.	k.A.	9,84 µg/ml

Fortsetzung Tabelle 2.3:

gemessener Rückstand	gemessen in	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	C <sub>nach 24 h</sub>	T <sub>1/2</sub>	Referenz
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	0,7 µg/ml	17 h	k.A.	k.A.	19
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	0,63 u. 0,72 µg/ml	8 u. 7 h	k.A.	k.A.	k.A.
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	0,85 µg/ml	18 h	k.A.	k.A.	k.A.
Ceftiofur+Metaboliten	Plasma	3,74 µg/ml	9 h	k.A.	k.A.	k.A.
Ceftiofur	Plasma	13,8 µg/ml	1 - 1,5 h	k.A.	k.A.	9,7 h 20
Ceftiofur	Plasma	14,5 µg/ml	0,67 h	k.A.	k.A.	10,3 h
Ceftiofur	Plasma	8,56 µg/ml	1 - 5 h	k.A.	k.A.	11,5 h
Ceftiofur	Plasma	11,0 µg/ml	1 - 4 h	k.A.	k.A.	12,0 h
DFA	Plasma	2,85 µg/ml	2 h	0,64 µg/ml	k.A.	21
	Endometrium	2,23 µg/g	4 h	0,56 µg/g	k.A.	k.A.

Legende:

\* = keine Angabe, ob es sich um Ceftiofur-Natrium (Na) oder Ceftiofur-Hydrochlorid (HCl) handelt;

DFC = Desfuroylceftiofur; DFA = Desfuroylceftiofur-Acetamid;

k.A. = keine Angabe; KGW = Körpergewicht; NWG = Nachweisgrenze; 1xd = einmal täglich; min = Minuten; h = Stunde(n);

C<sub>max</sub> = gemessene Maximalkonzentration; C<sub>nach 24h</sub> = gemessene Konzentration nach 24 h;

T<sub>max</sub> = Zeitpunkt der gemessenen Maximalkonzentration; T<sub>1/2</sub> = Halbwertszeit

Referenz.

- |                                 |                                     |  |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1) BANTING <i>et al.</i> (1989) | 8) HALSTEAD <i>et al.</i> (1992)    | 15) ROBB <i>et al.</i> (1997a)                               |
| 2) SOBACK <i>et al.</i> (1989)  | 9) ERSKINE <i>et al.</i> (1995)     | 16) PHARMACIA & UPJOHN COMPANY (1998)                        |
| 3) JAGLAN <i>et al.</i> (1990)  | 10) WEISKOPF und KAUSCHE (1995)     | 17) EMEA (1999a)   |
| 4) OWENS <i>et al.</i> (1990)   | 11) WHITTEM <i>et al.</i> (1995)    | 18) BROWN <i>et al.</i> (2000)                               |
| 5) BROWN <i>et al.</i> (1991a)  | 12) BROWN <i>et al.</i> (1996)      | 19) EMEA (2002a)   |
| 6) BROWN <i>et al.</i> (1991b)  | 13) VERMEERSCH <i>et al.</i> (1996) | 20) HORNISH und KOTARSKI (2002)                              |
| 7) SOBACK <i>et al.</i> (1991)  | 14) BROWN <i>et al.</i> (1997)      | 21) OKKER <i>et al.</i> (2002); SCHMITT <i>et al.</i> (2000) |

## **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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Usleber für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichnete Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. E. Schneider danke ich die allzeit gewährte Unterstützung und die zahlreichen Anregungen sowie die freundliche Hilfe und Sorgfalt bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Weiter möchte ich den Mitarbeitern der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer, der Justus-Liebig-Universität Gießen und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München – insbesondere Frau Dr. A. Strasser – für die freundliche Hilfe und gute Zusammenarbeit danken.

Schließlich möchte ich allen Kollegen des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, der Justus-Liebig-Universität Gießen, sowie allen Freunden und Familienangehörigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5256-0

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



0 17 8 3 8 3 5 1 9 5 2 5 6 0 0