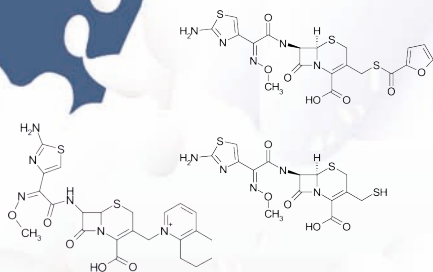


Untersuchungen zum Rückstandsnachweis von
Cephalosporin-Antibiotika in Kuhmilch nach
therapeutischer Applikation unter Verwendung
immunchemischer und mikrobiologischer Verfahren

MONIKA STEFFEN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
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 2012

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.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

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

Untersuchungen zum Rückstandsnachweis von
Cephalosporin-Antibiotika in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation
unter Verwendung immunchemischer und mikrobiologischer Verfahren

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

eingereicht von
MONIKA STEFFEN
Tierärztin aus Wittlich

Gießen 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. Bostedt

Tag der Disputation: 21. Juni 2012

*Ich habe mein Glück gefunden.
Meinem Mann und meinen Kindern in Liebe und Dankbarkeit*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	SCHRIFTTUM.....	3
2.1.	Cephalosporine	
	Allgemeines zu Cephalosporinen.....	3
2.1.1	Cefquinom.....	5
2.1.1.1	<i>Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften.....</i>	5
2.1.1.2	<i>Pharmakokinetik.....</i>	8
2.1.1.3	<i>Toxizität und Nebenwirkungen.....</i>	9
2.1.2.	Ceftiofur und Desfuroylceftiofur.....	9
2.1.2.1	<i>Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften.....</i>	9
2.1.2.2	<i>Pharmakokinetik.....</i>	12
2.1.2.3	<i>Toxizität und Nebenwirkungen.....</i>	15
2.2	Therapeutische Anwendung von Cefquinom und Ceftiofur in der Veterinärmedizin.....	15
2.2.1	Cefquinom.....	15
2.2.2	Ceftiofur.....	18
2.3	Bedeutung und rechtliche Bewertung von Rückständen von Cefquinom und Ceftiofur in der Milch.....	20
2.3.1	Cefquinom-Rückstände in Milch.....	24
2.3.2	Ceftiofur-Rückstände in Milch.....	25
2.4	Nachweisverfahren für Cephalosporine in Milch.....	26
2.4.1	Mikrobiologische Verfahren.....	26
2.4.2	Rezeptorbindungstests.....	28
2.4.3	Enzymatische Tests.....	30
2.4.4	Immunologische Tests.....	31

2.4.5	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren.....	33
2.4.6	Sonstige Verfahren.....	34
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	40
3.1	Tiere, Materialien und Geräte.....	40
3.1.1	Tiere.....	40
3.1.2	Eingesetzte Präparate und Beschreibung der Applikation.....	45
3.1.2.1	<i>Cefquinom</i>	45
3.1.2.2	<i>Ceftiofur</i>	46
3.1.3	Chemikalien und Biochemika.....	48
3.1.4	Antibiotika.....	48
3.1.5	Puffer und Lösungen.....	48
3.1.6	Immunreagenzien.....	49
3.1.7	Probenmaterial.....	50
3.1.8	Geräte.....	50
3.1.9	Sonstige Materialien.....	50
3.2	Methodik.....	51
3.2.1	Probengewinnung und Probenaufbereitung.....	51
3.2.2	Enzymimmunologische Nachweise.....	55
3.2.2.1	<i>Enzymimmunologischer Nachweis von Cefquinom</i>	55
3.2.2.2	<i>Enzymimmunologischer Nachweis von DFC</i>	56
3.2.3	Durchführung des Rezeptortests (β -s.t.a.r.).....	57
3.2.4	Durchführung des Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT).....	58
4	ERGEBNISSE.....	60
4.1	Überprüfung der Testsysteme zum Nachweis von Cefquinom.....	60
4.2	Überprüfung der Testsysteme zum Nachweis von Desfuroylceftiofur	61

4.3	Nachweis von Cefquinom in Milch nach gleichzeitiger intramuskulärer und intramammärer Applikation.....	64
4.4	Nachweis von Cefquinom in Milch nach dem Trockenstellen.....	72
4.5	Nachweis von Desfuroylceftiofur in Milch nach systemischer Applikation.....	78
5	DISKUSSION.....	85
5.1	Nachweis von Cefquinom-Rückständen in der Milch nach therapeutischer Applikation.....	86
5.2	Nachweis von Desfuroylceftiofur-Rückständen in der Milch nach therapeutischer Applikation.....	91
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
7	SUMMARY.....	98
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
8.1	Zitierte Rechtsvorschriften.....	127
9	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	129
10	ANHANG.....	132

1 EINLEITUNG

Euterkrankheiten zählen zu den wichtigsten und wirtschaftlich bedeutsamsten Abgangsursachen in der Rinderpraxis (ZEHLE et al. 2004; KIETZMANN und BÄUMER 2008; LKV 2008).

Trotz Optimierung zahlreicher Umweltfaktoren zur Minimierung des Infektionsrisikos mit Mastitiserregern ist eine Therapie mit antimikrobiell wirksamen Substanzen oft unumgänglich. Neben den klassischen Penicillinen sind heute Wirkstoffe mit kurzer Wartezeit von Interesse. Von zunehmender Bedeutung hierbei sind die Cephalosporine, insbesondere die Wirkstoffe Cefquinom und Ceftiofur. Obwohl im Rahmen des Zulassungsverfahrens für Tierarzneimittel auch Daten zur Ausscheidung in Milch an die EMA geliefert werden müssen, werden diese Daten als „Betriebsgeheimnis“ behandelt und daher in der Regel nicht veröffentlicht. Aus wissenschaftlicher Sichtweise wäre es jedoch dringend erforderlich, Daten zur Ausscheidung dieser Substanzen in Milch zur Verfügung zu haben, auch um eine Bewertung der Rückstandsproblematik zu erleichtern.

Zudem stellt sich im Hinblick auf den Verbraucherschutz die Frage, wie eine sehr kurze Wartezeit bei gleichzeitig guter Wirksamkeit im Hinblick auf die Ausscheidung in die Milch zu sehen ist, insbesondere auf eine mögliche individuelle Variabilität der Ausscheidung.

Bis heute liegt zur Untersuchung von Milch auf antimikrobielle Rückstände kein Testsystem vor, mit dem gleichzeitig alle in der landwirtschaftlichen Nutztierpraxis eingesetzten Antibiotika zuverlässig nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund wurde ein integriertes Nachweissystem entwickelt, das durch Kombination von mikrobiologischen Tests, Rezeptorbindungstests, immunologischen und physikalisch-chemischen Verfahren, eine möglichst große Bandbreite an Substanzen auf MRL-Niveau erfassen kann (HEESCHEN und SUHREN 1996; SUHREN und HEESCHEN 1996; SUHREN 2002; HOLTKÖTTER et al. 2002; KIRST 2008). Entscheidend ist dabei nicht nur der qualitative Nachweis einer pharmakologisch wirksamen Substanz, sondern auch die quantitative Erfassung bei möglichst geringem Zeit- und Kostenaufwand.

Cefquinom wird im Rahmen der Hemmstoffkontrollen in Anlieferungsmilch qualitativ nachgewiesen, dies aber erst oberhalb des MRL-Niveaus. Zwar existieren physikalisch-

chemische Verfahren oder z.B. das von THAL (2006) entwickelte enzymimmunologische Nachweisverfahren, die dem Nachweis im Rahmen der Rückstandshöchstmengenverordnung gerecht werden, diese Verfahren werden aber in der Routineuntersuchung nicht eingesetzt (MITCHELL et al. 1998; SUHREN und REICHMUTH 1998 a, b; OKERMAN et al. 2003; SUHREN und KNAPPSTEIN 2003).

Eine ähnliche Problematik ergibt sich für Ceftiofur bzw. dessen Hauptmetaboliten Desfuroylceftiofur (DFC). Ceftiofur wird nach systemischer Applikation vollständig metabolisiert und als Desfuroylceftiofur über die Milch ausgeschieden (JAGLAN et al. 1992; EMEA 1999; BROWN et al. 1999, 2000; BECKER et al. 2003; HORNISH et al. 2003). Um eine tatsächliche Aussage über die Hemmstofffreiheit der Milch zu treffen, sollte deshalb DFC möglichst miterfasst werden. Mit dem Routine-Hemmstofftest ist DFC jedoch erst weit oberhalb der Höchstmenge erfassbar.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, unter Verwendung von zwei am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelten enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Cefquinom (THAL 2006) und Ceftiofur bzw. Desfuroylceftiofur (MEIER 2008) mögliche Rückstände in der Milch behandelter Kühe nachzuweisen und deren Konzentration im Hinblick auf die zulässigen MRL-Werte und Wartezeiten der angewendeten Arzneimittel zu überprüfen.

Gleichzeitig sollte in dieser Anwendungsstudie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Enzymimmuntests mit denjenigen eines Rezeptortests (β ta-s.t.a.r.) und eines verbesserten mikrobiologischen Testsystems (Brillantschwarz-Reduktionstest, BRT) geprüft werden.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Cephalosporine**

Allgemeines zu Cephalosporinen

Den Penicillinen und den Cephalosporinen gemeinsam ist die β -Laktamringstruktur, weshalb sie auch als β -Laktam-Antibiotika bezeichnet werden. Während die Struktur der Penicilline auf der 6-Aminopenicillansäure aufbaut, leiten sich die Cephalosporine, wie auch Cephamycine und Oxacepheme, Carbapeneme und Monolactame von der 7-Amino-Cephalosporansäure ab (KROKER 2006). Da die Cephalosporine sowohl in der 3- als auch in der 7- β -Position variiert werden können, bieten sie im Gegensatz zu den Penicillinen, die meist nur an der 6-Aminogruppe substituiert werden, bessere Möglichkeiten zur strukturellen Modifikation und Wirkungsoptimierung (GRÄFE 1992).

So wurden im Laufe der Zeit die Cephalosporine besonders im Bereich des Wirkungsspektrums und der Stabilität gegenüber β -Laktamasen optimiert, wonach die Einteilung nach Entwicklungsgrad in vier verschiedene Generationen erfolgen kann.

Wiederum andere Autoren erachten eine Einteilung anhand der Darreichungsform – parenteral oder oral anwendbare Stoffe – oder auch eine Einteilung nach Eigenschaften und chemischen Strukturmerkmalen als sinnvoller (GRÄFE 1992; KROKER 2006).

Der Wirkmechanismus geht für alle β -Laktam-Antibiotika mit einer Hemmung der Biosynthese der bakteriellen Zellwand einher. Angriffsziel sind dabei die Penicillin-bindenden Proteine (PBP) der Bakterienzellwand. Die PBP sind Transpeptidasen, deren Name sich von ihrer großen Affinität zu Penicillinen herleitet. Die Transpeptidasen sind beteiligt an der Vernetzung des Mureingerüsts der bakteriellen Zellwand. Grampositive Bakterien besitzen im Gegensatz zu den gramnegativen Bakterien eine dickere Mureinschicht. Murein ist ein Peptidoglykan, dessen Glykanketten, bestehend aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, durch Peptidketten miteinander quervernetzt sind. Die Transpeptidasen verbinden zwei Peptidoglykanstränge, indem ein Glycinrest einer Pentaglycinbrücke mit einem D-Alanin des anderen Stranges verknüpft wird.

Das β -Laktam-Gerüst der β -Laktam-Antibiotika ist der D-Alanyl-D-Alanin-Gruppe der Transpeptidase strukturverwandt und inhibiert somit die Peptidoglykansynthese des Enzyms. Daraus resultiert ein instabiles Peptidoglykangerüst der Bakterienzellwand, wodurch sie dem steigenden Innendruck durch Wachstum der Bakterienzelle nicht mehr standhalten kann. Letztlich führt dies zur Zellyse, β -Lactam-Antibiotika haben somit eine bakterizide Wirkung (LESSEL 1996; STAHLMANN und LOHDE 2001; KROKER 2006).

Allerdings besitzen einige Bakterien Resistenzmechanismen gegenüber den β -Laktam-Antibiotika. Dies kann zum einen eine geringere Anfälligkeit des Zielenzym gegenüber β -Lactamen sein. Zum anderen spielen Permeabilitätsveränderungen der äußeren Membran eine Rolle. Nicht zuletzt kann das Antibiotikum durch bakterieneigene Enzyme zerstört oder modifiziert werden. Wichtig zu nennen sind die β -Lactamasen, die die β -Laktam-Bindung hydrolytisch spalten und dadurch das Antibiotikum inaktivieren. Die Inaktivierung durch β -Lactamasen zählt zu den verbreitetsten Resistenzmechanismen gegenüber β -Lactam-Antibiotika (THEURETZBACHER 1998; WITTE und MIELKE 2003; ROBERT KOCH INSTITUT 2007).

Die β -Lactamasen sind bei grampositiven Bakterien im Aussenbereich der Zellmembran konzentriert und werden als Exoenzyme ausgeschieden. Bei gramnegativen Bakterien hingegen befinden sie sich im periplasmatischen Raum, der zwischen der äußeren Bakterienmembran mit dem Mureingerüst und der inneren Bakterienmembran gelegen ist (LESSEL 1996; PIDDOCK et al. 1997; PITOUT et al. 1997; THEURETZBACHER 1998; STAHLMANN und LODE 2001).

β -Lactamasen sind in der Lage das eingesetzte Antibiotikum als Substrat umzusetzen und somit eine irreversible Bindung des β -Lactam-Antibiotikums an Transpeptidasen zu verhindern. Die bakterielle Zellwandsynthese kann unbehindert voranschreiten, die antibiotische Wirkung des β -Lactam-Antibiotikums ist aufgehoben (LESSEL 1996).

Es existieren über 100 Vertreter von β -Lactamasen. Eine Möglichkeit der Einteilung dieser Enzyme ist das Klassifizierungsschema nach AMBLER. Es werden die Metallo- β -Lactamasen von den Serin- β -Lactamasen unterschieden. Zu den Vertretern der letztgenannten β -Lactamasen gehören unter anderem die Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL), die in der Lage sind die meisten β -Lactam-Antibiotika, auch

Cephalosporine der 3. und 4. Generation, zu hydrolisieren. Aufgrund verschiedener Punktmutationen in den β -Lactamase-Genen besitzen sie ein erweitertes Substratspektrum. Ein Austausch der ESBL-Gene erfolgt über konjugative Plasmide. Da ein Plasmid gleichzeitig mehrere Transposons (mobile Elemente) mit Genen übertragen kann, besteht die Möglichkeit der Entstehung von multiresistenten Erregern (WITTE und MIELKE 2003; ROBERT KOCH INSTITUT 2007; EMA 2012).

Ein für β -Lactam-Antibiotika weiterer wichtiger Resistenzmechanismus der Bakterienzelle ist die Synthese eines modifizierten Penicillin-bindenden Proteins (PBP2a) wie im Falle der *Methicillin-resistenten Staphylococcus-aureus-Keime (MRSA)*. *MRSA* besitzen das Resistenzgen *mecA* (kodiert das modifizierte PBP2a) und regulatorische Elemente, die in ihrer Gesamtheit ein mobiles genetisches Element bilden, die Staphylokokken-Kassette (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*). Diese kann durch horizontalen Gentransfer von *Staphylococcus aureus* aufgenommen werden und so die Resistenz gegen alle β -Lactam-Antibiotika vermitteln (LESSEL 1996; DULLWEBER 2010).

2.1.1 Cefquinom

2.1.1.1 Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften

Cefquinom (siehe Abbildung 2.1) ist einer der wenigen Wirkstoffe aus der Gruppe der Cephalosporine die ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzt werden. Es gehört zu den Vertretern der vierten Generation (BÖTTNER 1995; EMEA 2003; KROKER 2006; INTERVET 2009). Es zeichnet sich durch sein breites Wirkungsspektrum gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterien und durch seine β -Lactamasestabilität aus, die aus einer Aminothiazolylgruppe resultiert (CHIN et al. 1992; BÖTTNER et al. 1995). An Position C-3 befindet sich eine bipyklische Pyridinium-Gruppe, die LIMBERT et al. (1990) und CHIN et al. (1992) ebenfalls für die hohe β -Lactamasestabilität verantwortlich machen. Somit ist Cefquinom weitestgehend resistent gegenüber einer Hydrolyse durch β -Lactamasen, besonders derer von *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* (BÖTTNER et al., 1995).

Cefquinom, wie auch die übrigen Cephalosporine, verbindet sich vorzugsweise mit Penicillin-bindenden Proteinen der bakteriellen Zellwand, was am Beispiel von *Escherichia coli* K-12 beschrieben wird (LIMBERT et al. 1990; ROSE et al. 1996 b).

Cefquinom, oder auch (6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo-3-(5,6,7,8-tetrahydrochinolin-1-ylmethyl)-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0.]oct-2-en-2-carboxylatsulfat, hat eine Molekülmasse von 626,68. Die Summenformel lautet $C_{23} H_{24} N_6 O_5 S_2$ (VETIDATA 2008).

Cefquinom weist als organische Säure pK_a -Werte von 2,5 und 2,9 auf, seine Fettlöslichkeit ist gering (KNAPPSTEIN et al. 2005).

Cefquinom wird parenteral eingesetzt, entweder subkutan bzw. intramuskulär, in der Mastitistherapie vor allem intramammär. Im Handelspräparat Cobactan[®] liegt Cefquinom als Cefquinomsulfat vor. Der Euterinjektor in Salbenform sollte nicht über 30 °C gelagert werden. Ein Überschreiten der Temperatur kann zu Veränderungen von Farbe und Homogenität der Salbenformulierung führen, ebenso wurde eine steigende Viskosität bestätigt (KNAPPSTEIN et al. 2005; INTERVET 2009).

Die Injektionssuspension zur systemischen Anwendung sollte nicht über 25 °C und vor Licht geschützt gelagert werden (INTERVET 2009).

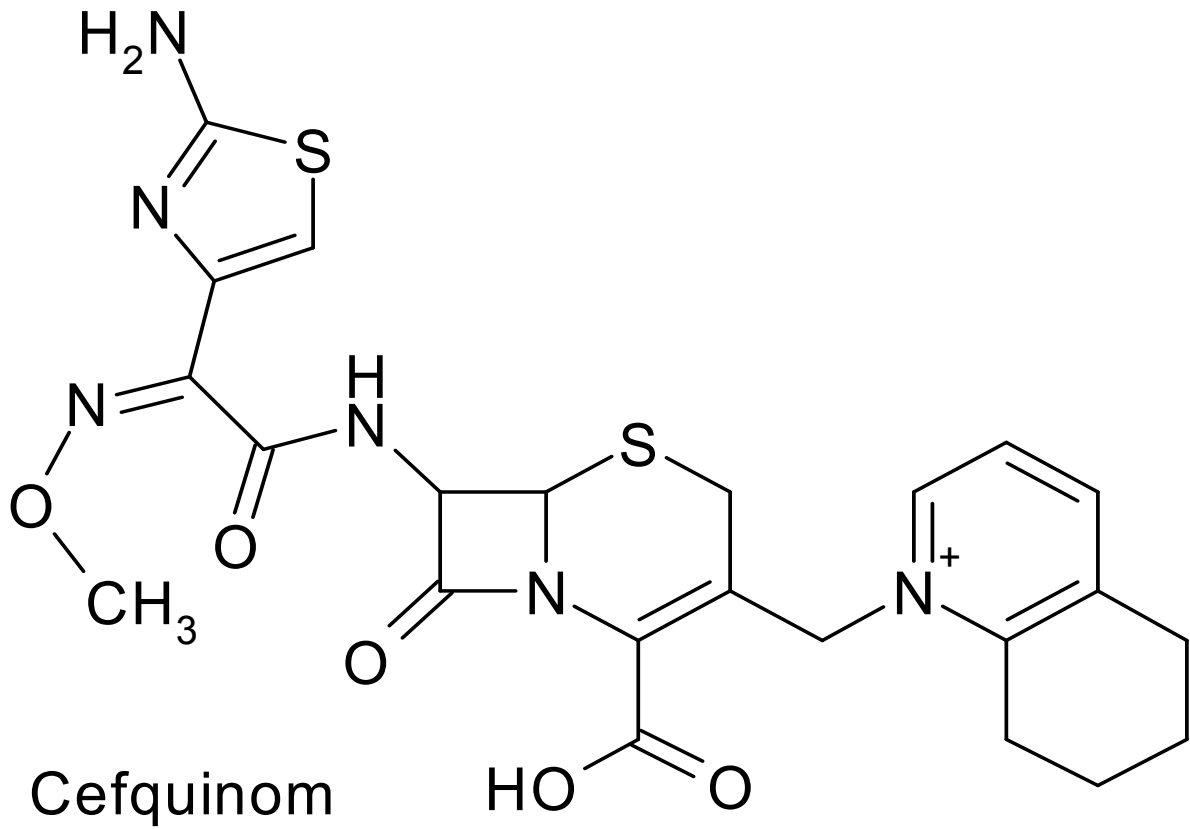


Abbildung 2.1: Strukturformel von Cefquinom.

2.1.1.2 Pharmakokinetik

Cefquinom wird nach intramuskulärer und subkutaner Applikation schnell resorbiert, sodass beim Rind nach systemischer Verabreichung die maximale Serumkonzentration nach eineinhalb bis zwei Stunden von 3 µg/ml erreicht wird. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei ungefähr zweieinhalb Stunden (EMEA 1995; KROKER 2006; VETIDATA 2008).

Die Bindung von Cefquinom an Plasmaproteine liegt im Bereich von 5-15% (LIMBERT 1990; EMEA 1995; ROSE et al. 1996 a; VETIDATA 2008).

Die höchsten Cefquinom-Konzentrationen wurden im Bereich der Injektionsstelle, in den Nieren und der Leber gemessen (EMEA 1995). Therapeutische Spiegel bleiben im Bronchialsekret über cirka 24 Stunden erhalten (ROSE et al. 1996 a).

Liegen im Gewebe höhere pH-Werte vor, wie im Falle des Eutergewebes bei einer Mastitis (pH 7,2-7,4 im Vergleich zum „Normalfall“ bei pH 6,8), diffundiert der Wirkstoff besser aus dem Blut in das Eutergewebe. Untersuchungen zeigten eine 60% höhere Cefquinom-Konzentration in Milch euterkranker Kühe (INTERVET 2007).

Cefquinom wird nahezu unmetabolisiert über die Nieren ausgeschieden. Beim Kalb und auch beim adulten Rind werden 84-95% des Wirkstoffes über den Urin eliminiert, die restlichen 5% werden über die Faeces ausgeschieden (CLINI PHARM 2008; VETIDATA 2008).

Zwölf Stunden nach intramammärer Applikation von Cefquinom werden Wirkstoffgehalte von ca. 19 µg/ml in Milch gemessen. Wirksame Konzentrationen finden sich bis 24 Stunden nach intramammärer Verabreichung. Es wird nur ein sehr geringer Teil systemisch absorbiert, 24 Stunden nach Therapiebeginn finden sich Konzentrationen unter 200 µg/kg im Nierengewebe. Die Ausscheidung erfolgt hierbei hauptsächlich über die Milch (EMEA 1995; KNAPPSTEIN et al. 2005; CLINI PHARM 2008; VETIDATA 2008). Die niedrige systemische Absorption stehen für EHINGER et al. (2006) im Zusammenhang mit den chemisch-physikalischen Eigenschaften von Cefquinom. Als schwache Säuren liegen sie im Blutplasma und in der Milch überwiegend ionisiert vor und penetrieren Membranen, wie die Blut-Euter-Schranke, nur in geringem Maße, da diese nur von der nicht-ionisierten Fraktion passiert werden können (WALSER 1979; EHINGER 2006; KIETZMANN und BÄUMER

2008). Bei einer systemischen Gabe von Cefquinom werden in allen Drüsenbereichen des Euters relativ einheitliche Konzentrationen erreicht, die aber niedriger sind als nach lokaler intramammärer Applikation (EHINGER 2006).

2.1.1.3 Toxizität und Nebenwirkungen

Die akute Toxizität von Cefquinom ist niedrig. In 90 Tage-Studien an Ratten wurde eine klinisch auffällige hämolytische Anämie bei einer hohen Dosierung von 2500 mg Cefquinom/kg KGW nachgewiesen. In niedrigeren Dosen zeigten sich Veränderungen des Harnstoffgehaltes und der Erythrozyten im Urin. Es konnten bisher keine Hinweise auf Teratogenität, Mutagenität, Kanzerogenität, Immuntoxizität oder Reproduktionstoxizität nachgewiesen werden. Als Nebenwirkungen sind lokale Unverträglichkeiten an der Injektionsstelle möglich. (EMEA 1995; KLUGE und UNGEMACH 1998; VETIDATA 2008). HEINRITZI und HAGN (1999) beobachteten bei Sauen allergische Reaktionen in Form von Urtikaria und Schwellungen am Applikationsort.

2.1.2 Ceftiofur und Desfuroylceftiofur

2.1.2.1 Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften

Ceftiofur (siehe Abbildung 2.2) gehört zu den Vertretern der 3. Generation von Cephalosporin-Antibiotika (BECONI-BARKER et al. 1995 a).

Ceftiofur, oder auch (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, hat eine Molekülmasse von 560,03. Die Summenformel lautet $C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$ (MACNEIL 1996; KOSHY und CAZERS 1996).

Ceftiofur wird unter sauren, aber vor allem unter basischen Bedingungen (pH 10) (GILBERTSON et al. 1990; SUNKARA et al. 1999) rasch zum biologisch aktiven Hauptmetaboliten Desfuroylceftiofur und Furansäure metabolisiert (BECONI-BARKER et al. 1995 a, b). Ebenso entscheidend wie der pH-Wert ist die Abhängigkeit zur Temperatur. Je

höher die Inkubationstemperatur, desto höher auch die Zersetzungsrate von Ceftiofur (SUNKARA et al. 1999).

Ceftiofur wird bei Schweinen und Rindern parenteral als Ceftiofurhydrochlorid eingesetzt und zeichnet sich durch seine Wirksamkeit gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien und seiner erhöhten β -Laktamasestabilität aus (KROKER 2006; PHARMACIA GMBH, PFIZER 2007). Die gute antibakterielle Wirksamkeit beruht auf der 2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyaminoacetamid-Gruppe am C7 des Cephem-Kerns (STANKER et al. 1998).

Ceftiofur wird unter verschiedenen Bezeichnungen (z. B. Excenel[®] RTU, Naxcel[®]) ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzt. Ceftiofur wirkt bakterizid gegenüber *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Histophilus somni*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroides melanogenicus* und *Fusobacterium necrophorum*. (BLACKALL et al. 1996; DRILLICH et al. 2001; PHARMACIA GMBH, PFIZER 2007).

Ebenso liegen einige Studien zum parenteralen Einsatz von Ceftiofur in der Mastitistherapie vor, wobei sich der Wirkstoff an dieser Stelle nicht durchsetzen konnte. Bis nach parenteraler Applikation von Ceftiofur ein ausreichend hoher Wirkstoffspiegel im Eutergewebe erzielt wird, können bei akuten oder perakut verlaufenden Mastitiden (beispielsweise Mastitiden verursacht durch *E. coli*) bereits irreversible Gewebeschäden eingetreten sein, ausgelöst durch die rasche Keimvermehrung und Produktion von Endotoxinen (OWENS et al. 1990; BERGMANN 1994; FUCHS 1994; ERSKINE et al. 1995, 2001, 2002; DE OLIVEIRA et al. 2000).

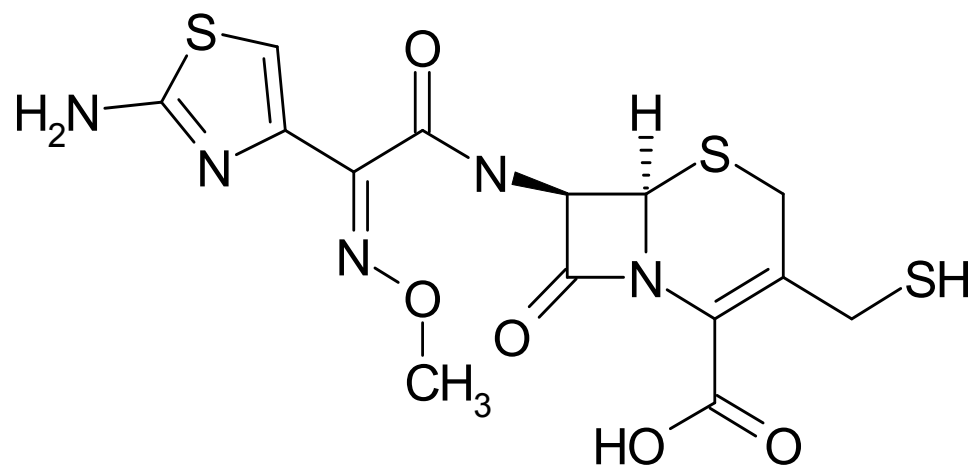
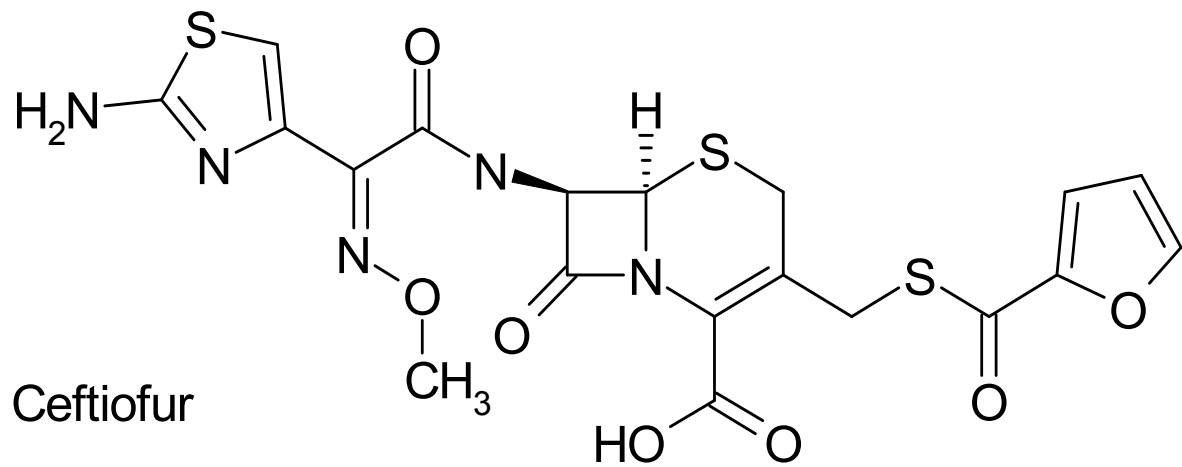


Abbildung 2.2: Strukturformel von Ceftiofur und seines Hauptmetaboliten Desfuoylceftiofur.

2.1.2.2 Pharmakokinetik

Die Applikation von Ceftiofur erfolgt beim Schwein intramuskulär, beim Rind hingegen subkutan. Die Halbwertszeit beträgt beim Schwein ca. 13 Stunden, beim Rind 9 Stunden. Die Verstoffwechslung erfolgt vornehmlich über die Leber (BAUMGARTNER 2002). Ceftiofur wird nach parenteraler Applikation durch Abspaltung von Furansäure rasch (<10 Minuten) zu Desfuroylceftiofur metabolisiert (BECONI-BARKER et al. 1997; BROWN et al. 1999, 2000; BECKER et al. 2003; HORNISH et al. 2003).

Des Weiteren folgen reversible Metabolisierungsprozesse zu Disulfiden, wie z. B. dem 3,3-DFC-Disulfid (DFC-Dimer), DFC-Cystein-Disulfid, DFC-Glutathion-Disulfid und DFC-Protein-Konjugat (siehe Abbildung 2.3). DFC kann reversibel an Makromoleküle im Plasma und im Gewebe gebunden vorliegen oder als freies DFC, welches bei intaktem β -Lactam-Ring den antimikrobiell wirksamen Metaboliten des Ceftiofurs darstellt.

Untersuchungen von BECONI-BARKER et al. (1996) ergaben, dass lediglich DFC als Ceftiofur-Metabolit im Blutplasma gefunden werden konnte. Der Prozentanteil an freiem DFC ist verschwindend gering, zu 50 bis 100% liegt es an Proteinen gebunden vor.

Da all die genannten Metabolisierungsprozesse reversibel sind, ist es möglich, eine Versorgung mit DFC über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten (JAGLAN et al. 1992; BECONI-BARKER et al. 1995 a, b; BECONI-BARKER et al. 1996; SALMON et al. 1996; BROWN 1999; OKKER et al. 2002; HORNISH et al. 2003; KROKER 2006).

Die Plasmahalbwertszeit von Ceftiofur und DFC beträgt zwischen 30 Minuten und zwei Stunden, die höchsten Konzentrationen nach Applikation finden sich bei allen Tierarten nach ca. 12 Stunden in den Nieren, gefolgt von Lunge, Leber, Fettgewebe und Muskulatur (BECONI-BARKER et al. 1996; EMEA 1999). BROWN et al. (1999, 2000), BECKER et al. (2003) und HORNISH et al. (2003) war es spätestens 10 Minuten nach Applikation nicht mehr möglich die Muttersubstanz Ceftiofur im Blutplasma nachzuweisen.

Die Ausscheidung von Ceftiofur als DFC erfolgt zu mehr als 60% über den Urin, bei Schafen liegt dieser Prozentanteil bei über 90%. Der restliche Anteil wird über die Faeces ausgeschieden. Dort fanden sich vor allem der Hauptmetabolit DFC, DFC-Cystein-Disulfid

und 3,3-Desfuroylceftiofur-Disulfid (DFC-Dimer), wohingegen kaum eine Spur der Muttersubstanz nachweisbar war (JAGLAN et al. 1992; BECONI-BARKER et al. 1995 b, 1996; SALMON et al. 1996; EMEA 1999).

Bei laktierenden Kühen wird nur ein sehr geringer Prozentanteil (ca. 0,1%) der parenteral verabreichten Ceftiofur-Dosis in die Milch ausgeschieden. Auch hier liegt nicht die Muttersubstanz Ceftiofur vor, sondern DFC, teilweise an Proteine gebunden, oder als Cysteindisulfid (JAGLAN et al. 1992; EMEA 1999; BECKER et al. 2003).

Nach intramammärer Applikation finden sich dagegen auch Rückstände der Muttersubstanz im Milchsekret, wobei diese bei erkrankten Kühen länger nachweisbar sind als bei eutergesunden Tieren (TYCZKOWSKA et al. 1993; ERSKINE et al. 1995; SMITH et al. 2004; MAKESWARAN et al. 2005). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass in erkrankten Arealen die Anzahl an Entzündungsmediatoren hoch ist, die Ceftiofur, das zum größten Teil an Proteine gebunden ist, mit sich tragen (OKKER et al. 2002; WASHBURN et al. 2005).

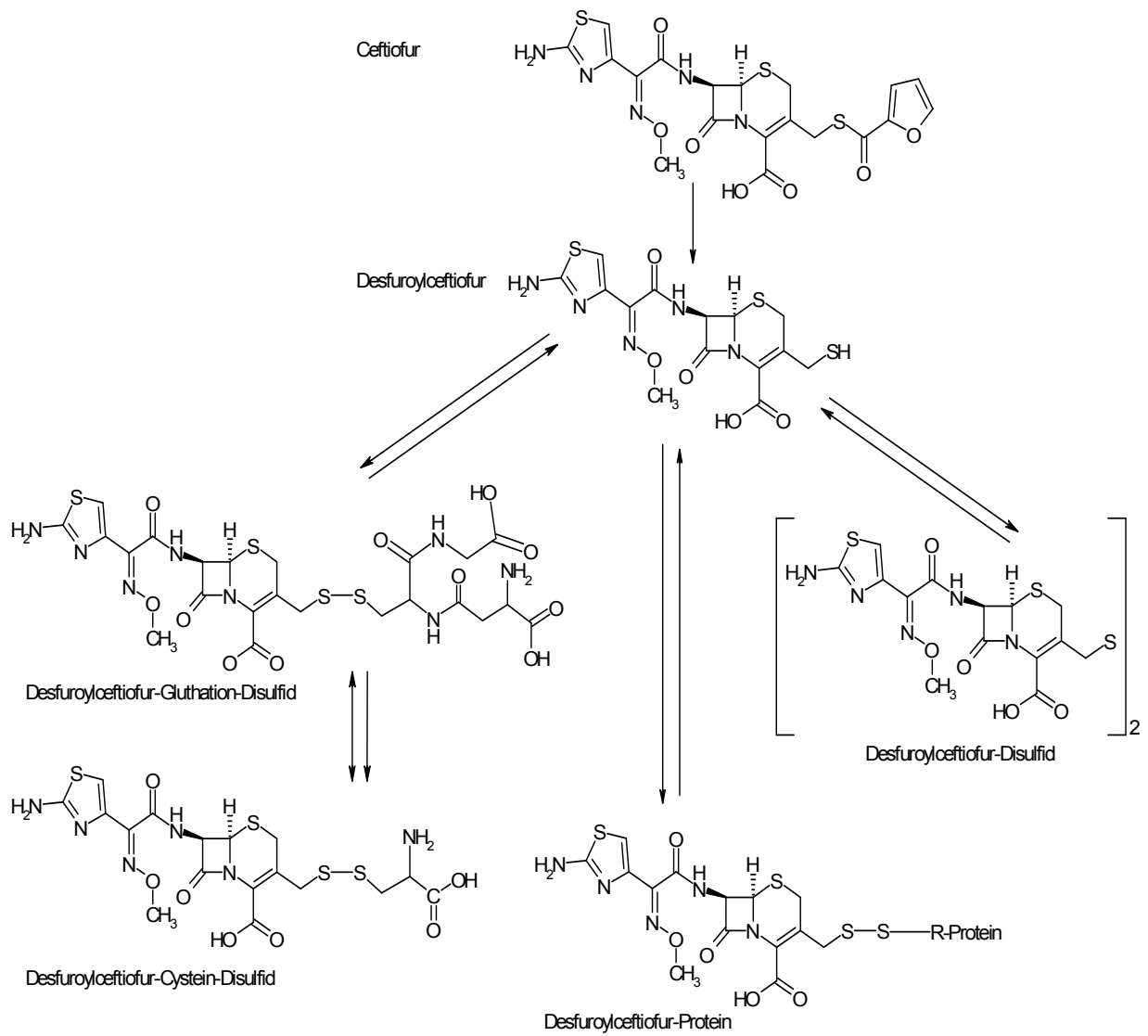


Abbildung 2.3: Von JAGLAN et al. (1992) postulierte Metabolisierung von Cefuroxime nach intramuskulärer Applikation beim Rind.

2.1.2.3 Toxizität und Nebenwirkungen

Ceftiofur weist nur eine sehr geringe Toxizität auf. Wie bei allen Cephalosporinen und Penicillinen ist jedoch bei allen Applikationsformen die Möglichkeit von Überempfindlichkeitsreaktionen zu beachten (EMEA 1999; KAUSCHE und ROBB 2003; PHARMACIA GMBH, PFIZER 2007).

KLUGE und UNGEMACH (1998) beschreiben nach der Applikation von Ceftiofur an der Injektionsstelle (Rind und Schwein) vorübergehende Gewebereizungen und Schwellungen.

In 90-Tage-Studien an Ratten wurden bei Applikation von hohen Dosen (3000 mg/kg KGW) erniedrigte Serumglucosewerte, Störungen im Elektrolythaushalt, eine erniedrigte Erythrozytenzahl und Störungen des Gastrointestinaltraktes beobachtet. Bei gleicher Dosierung zeigten sich beim Hund Veränderungen des hämatopoetischen Systems.

Bezüglich weiterer negativer Wirkungen ergaben sich bisher keine Hinweise auf teratogene, mutagene, kanzerogene, immuntoxische oder reproduktionstoxische Eigenschaften von Ceftiofur. Versuche an Meerschweinchen ergaben, dass auch Desfuroylceftiofur Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut auslösen kann (EMEA 1999).

FOREMANN (1998) konnte in Untersuchungen an Pferden keinen Zusammenhang zwischen der parenteralen Gabe (i.m.) von Ceftiofur und der Häufigkeit des Auftretens von Diarrhoe nachweisen.

2.2 Therapeutische Anwendung von Cefquinom und Ceftiofur in der Veterinärmedizin

2.2.1 Cefquinom

Cefquinom wird in Deutschland unter dem Handelsnamen Cobactan[®] vertrieben, wobei verschiedene Präparate verfügbar sind.

Cobactan[®] LA 7,5% ist bei Atemwegserkrankungen des Rindes, jedoch nicht bei laktierenden Kühen, ausgelöst durch *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* und *Histophilus somni*, zugelassen. Die Wartezeit für essbare Gewebe beträgt 13 Tage.

Als Cobactan[®] 4,5% Pulver (Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung ist der Packung beigelegt) findet Cefquinom Anwendung bei bakteriellen Erkrankungen des Atemtraktes (hervorgerufen durch *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica*) und bei Septikämien. Dieses Präparat ist für Pferde und Rinder zugelassen. Bei Rindern umfasst die Anwendung auch die Therapie von Dermatitis digitalis, infektiöser Bulbar-Nekrose und akuter interdigitaler Necrobazillose (Panaritium).

Die Indikationen beim Rind decken sich mit denen einer für Rind und Schwein zugelassenen 2,5% igen Injektionssuspension, Unterschiede bestehen in der Länge der Wartezeit.

Bei der 4,5% igen Formulierung beträgt die Wartezeit 2 Tage für essbares Gewebe und 36 Stunden für Milch, bei der 2,5% igen Suspension beträgt die Wartezeit 5 Tage für essbares Gewebe und 1 Tag für Milch.

Cobactan[®] LC ist eine Formulierung von Cefquinom zur intramammären Applikation bei laktierenden Kühen. Es wird häufig in Kombination mit Cobactan[®] 2,5% igen Suspension eingesetzt, um eine lokale als auch systemische Abdeckung gegenüber gramnegativen und grampositiven Mastitiserregern (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus uberis*) zu gewährleisten.

Die empfohlene Dosierung für die 2,5% Injektionslösung liegt bei adulten Rindern bei 1 mg Cefquinom/kg KGW bei einer Anwendung einmal täglich an drei bis fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Zur lokalen Behandlung wird jeweils ein Injektor pro Melkzeit (alle 12 Stunden) und Euterviertel mit je 75 mg Cefquinom an drei aufeinanderfolgenden Melkzeiten in die Zitze instilliert. Die Wartezeit für letztere Formulierung beträgt für essbare Gewebe 4 Tage und für Milch 5 Tage.

Weiterhin wird ein Trockensteller mit 150 mg Cefquinom pro Euterinjektor unter dem Handelsnamen Cobactan[®] DC vertrieben. Die Formulierung umfasst die für Cobactan[®] LC aufgeführten empfindlichen Erreger. Auf essbares Gewebe gilt eine Wartezeit von zwei

Tagen, die Wartezeit auf Milch variiert je nach Zeitpunkt des Trockenstellens. So beträgt sie einen Tag nach dem Abkalben, wenn die Trockenstehperiode länger als fünf Wochen ist und 36 Tage nach der Behandlung, wenn die Trockenstehperiode fünf Wochen und weniger beträgt (INTERVET 2005, 2009; VETIDATA 2008).

Tabelle 2.1: Übersicht Cefquinom-haltiger Arzneimittel (Stand 2009).

Bezeichnung	Applikationsform	Tierart	Wartezeit Milch (Tage)
Cobactan [®] LA 7,5%	i.m.	Rinder, nicht bei laktierenden Kühen	nicht anwendbar
Cobactan [®] 4,5%	i.m., i.v.	Rind, Pferd	1,5
Cobactan [®] 2,5%	i.m.	Rind, Schwein	1
Cobactan [®] LC	i.mam.	Rind	5
Cobactan [®] DC	i.mam.	Rind	1 (Trockenstehperiode >5 Wochen) 36 (Trockenstehperiode ≤5 Wochen)

2.2.2 Ceftiofur

Ceftiofur ist in Deutschland unter anderem unter dem Handelsnamen Excenel[®] verfügbar. Laut EUROVET Lila Liste 20.1 ist Excenel[®] zum Zeitpunkt der Probengewinnung (2008) in drei verschiedenen Formulierungen auf dem deutschen Markt erhältlich. Excenel[®] 1 g und Excenel[®] 4 g als Trockensubstanz (Ceftiofur-Natriumsalz), welche zur intramuskulären Anwendung beim Rind und beim Schwein mit einem Lösungsmittel versetzt werden müssen und die gebrauchsfertige Suspension Excenel[®] RTU 50 mg/ml auf der Basis von Ceftiofurhydrochlorid, mit der Zulassung zur intramuskulären Injektion beim Schwein und zur subkutanen Injektion beim Rind (MÄRTLBAUER o.J.; LVN 2008)

Das Anwendungsgebiet erstreckt sich beim Schwein auf die Therapie bakterieller Atemwegserkrankungen verursacht durch *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Streptococcus suis*. Beim Rind ist es wirksam gegenüber *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* und *Histophilus somni*, den bakteriellen Erregern von Atemwegserkrankungen. Des Weiteren kommt es bei Rindern mit Panaritium (akute interdigitale Nekrobazillose), hervorgerufen durch *Fusobacterium necrophorum* und *Bacteroides melaninogenicus* und bei der akuten postpartalen Metritis, hervorgerufen durch *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* und *Fusobacterium necrophorum*, zum Einsatz.

Die Dosis für Rinder von 1 mg Ceftiofur pro kg KGW wird einmal täglich an drei bis fünf aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht.

Die Wartezeit für essbare Gewebe liegt beim Schwein bei 5 Tagen, beim Rind bei 8 Tagen (PHARMACIA GMBH, PFIZER 2007).

Nur bei diesem Präparat gilt die Wartezeit von null Tagen für Milch. Bei fachgemäßer Applikation treten laut EMEA (1999) keine Rückstände von Ceftiofur oder dessen Metaboliten in Milch auf, allerdings kann eine unsachgemäße Applikation, z. B. intramammär, zu erhöhten Rückstandsmengen in der Milch führen (MÄRTLBAUER o. J.; TYCZKOWSKA et al. 1993; ERSKINE et al. 1995; SMITH et al. 2004; MAKESWARAN et al. 2005).

Bis 2010 waren Cefotiofur-haltige Präparate nur von der Firma Pfizer verfügbar. Mit Auslaufen des Patentschutzes für Cefotiofur sind seit kurzem eine Reihe Cefotiofur-haltiger Arzneimittel auch von anderen Pharmafirmen erhältlich, auf die in Tabelle 2.2 kein Bezug genommen wird.

Tabelle 2.2.: Übersicht Cefotiofur-haltiger Arzneimittel (Stand 2009).

Bezeichnung	Applikationsform	Tierart	Wartezeit Milch (Tage)
Excenel® 1g	i.m.	Rind, Schwein	1
Excenel® 4g	i.m.	Rind, Schwein	1
Excenel® RTU 50 mg/ml	s.c. (Rind) i.m. (Schwein)	Rind Schwein	0

2.3 Bedeutung und rechtliche Bewertung von Rückständen von Cefquinom und Ceftiofur in der Milch

Zum Schutze des Verbrauchers vor toxikologischen Risiken und zur Sicherstellung der technologischen Qualität von Milch wurden 1990 in der VO 2377/90 (EWG) Höchstmengen, Maximum Residue Limits (MRLs) für Tierarzneimittelrückstände festgelegt. Am 16. Juni 2009 wurde die VO 2377/90 aufgehoben und durch die Rückstandshöchstmengenverordnung 470/2009 ersetzt. Die Anhänge I bis IV der VO 2377/90 wurden in die Tabellen 1 und 2 der VO 37(2010) überführt.

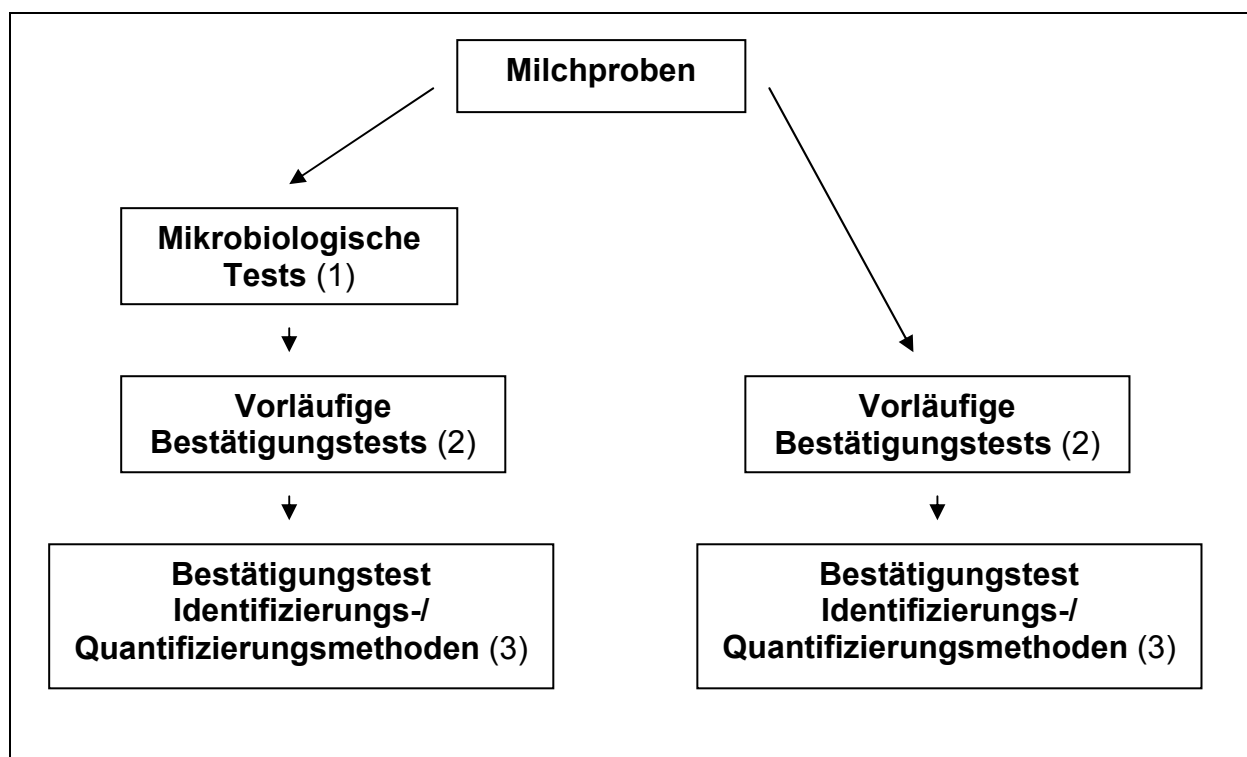
Für Ceftiofur ist der MRL-Wert für Milch 100 µg/kg (Summe aller den β-Lactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessenen Rückstände) und für Cefquinom 20 µg/kg (VO 2377/90 Anhang I bzw. VO 37(2010); EMEA 1995; SUHREN und REICHMUTH 1998 a, b; SUHREN 2002).

Ausgehend vom MRL-Wert wird die Wartezeit eines Arzneimittels für lebensmittelliefernde Tiere festgelegt (MITCHELL et al. 1998; SUHREN 2002; KIETZMANN 2004; KNAPPSTEIN et al. 2005, FABRE 2006).

Da bisher noch kein Testsystem entwickelt werden konnte, das alle antibiotisch wirksamen Substanzen auf MRL-Niveau erfassen kann, wurden „integrierte Nachweissysteme“ erstellt (Abbildung 2.4). Sinn dieser Systeme ist es, durch eine Kombination von verschiedenen Testverfahren bei der Untersuchung von Milch möglichst viele Substanzen (Hemmstoffe) nachzuweisen und Verantwortlichkeiten von Milcherzeuger, Milchverarbeiter und Lebensmittelüberwachung festzulegen (HEESCHEN und SUHREN 1996; SUHREN und HEESCHEN 1996; SUHREN 2002; HOLTKÖTTER et al. 2002; KIRST 2008).

Unter dem Begriff „Hemmstoffe“ werden im weitesten Sinne antimikrobiell wirksame Substanzen, körpereigene Abwehrstoffe, Reinigungs-, Desinfektions- und Konservierungsmittel zusammengefasst. Es sind Substanzen, die Mikroorganismen in ihrer Entwicklung hemmen oder abtöten (GEDECK 1986; BAUMGARTNER 2008; KIRST, 2008). Häufig wird der Begriff Hemmstoffe mit Antibiotika-Rückständen gleichgesetzt. Das Lebens- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) verbietet es, vom Tier gewonnene Lebensmittel in den Verkehr zu bringen, in oder auf denen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder

deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind (LFGB §10). Im Rahmen der Milch-Güteverordnung (MilchGüV) gelten diejenigen Substanzen als Hemmstoffe, die zu einem positiven Ergebnis im Hemmstofftest führen. Zur Feststellung von Hemmstoffen sind monatlich mindestens zwei Untersuchungen durchzuführen (laut MilchGüV). Die aktuell tatsächlich untersuchte Probenzahl beläuft sich auf monatlich vier Untersuchungen zur Feststellung von Hemmstoffen. Ein positiver Hemmstoffnachweis bedeutet für den Milcherzeuger neben einem Verlust der S-Klasse, einen Milchgeldabzug von 5 Cent/kg Milch (MilchGüV).



- (1) *Geobacillus stearothermophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus* u.a.
- (2) β -Lactamasen, Rezeptorbindungstests, Immuntests u. a.
- (3) HPLC, LC, u. a.

Abbildung 2.4: Übersicht über das integrierte System der Hemmstoff-Untersuchung.

Die intensive Überwachung der Anlieferungsmilch hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass positive Hemmstoffbefunde abgenommen haben (SUHREN 2002, KLOTH 2011).

Bundesweit reagierten 1986 0,2% der Proben Hemmstoff-positiv (BEYER 1986). Nach Angaben von SUHREN (2002) lag der Anteil an positiven Befunden im Jahr 2000 bei 0,09%, davon machten die β -Laktamantibiotika den höchsten Anteil von 98,1% an identifizierten Rückständen aus. An dieser Zahl hat sich seither nur recht wenig geändert, nach wie vor sind knapp 0,1% der Hemmstofftests positiv (Tabelle 2.3).

Neuere Daten von KRESS et al. (2007) zeigen, dass in Deutschland Penicilline immer noch die häufigste Hemmstoffursache sind, dass aber Cephalosporine zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Der LKV Rheinland-Pfalz hatte im Jahr 2008 von 222.922 untersuchten Milchproben 219 Proben (0,098%) als Hemmstoff-positiv befunden. Deutschlandweit wurde durch die Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V. (ADR) bei Qualitätsuntersuchungen durch die Landeskontrollverbände und Milchprüfringe für das Jahr 2007 folgende Werte (Tabelle 2.3) zusammengestellt.

Daten über eine genauere Differenzierung der Wirkstoffe, die zu den Hemmstoff-positiven Befunden geführt haben, liegen leider in keinem der Fälle vor (ADR 2008).

Im Jahresbericht 2007 des BVL zum Nationalen Rückstandskontrollplan wurden insgesamt 1.970 Milchproben überprüft, davon 1.343 auf antibakteriell wirksame Stoffe. Von diesen war lediglich eine Probe positiv auf das Antibiotikum Benzylpenicillin (entspricht 0,075%). Das BVL bewertet die erhobenen Ergebnisse als keine akute Gefährdung für den Verbraucher, allerdings verweist es auf das Risiko der Ausbildung von Resistenzen (BVL 2008/2009).

Tabelle 2.3: Häufigkeit Hemmstoff-positiver Befunde in Milch (Auszug aus „Rinderproduktion in Deutschland 2007“, Tabelle 4.19 „Qualitätsuntersuchungen (in 1.000) durch die Landeskontrollverbände und Milchprüfringe“ und Tabelle 4.20 „Einstufung der Anlieferungsmilch“, herausgegeben von der ADR (Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V.), Ausgabe 2008).

LKV	Zahl Hemmstoff- Untersuchungen (in 1.000)	Hemmstoff- positiv (in %)
Schleswig-Holstein	213	0,06
Niedersachsen/Bremen	165	0,10
Weser-Ems	211	0,07
Nordrhein-Westfalen	265	0,10
Hessen	156	0,11
Rheinland-Pfalz, Saarland	221	0,10
Baden-Württemberg	289	0,07
Bayern	1.908	0,04
Mecklenburg- Vorpommern	74	0,08
Brandenburg	13	0,08
Sachsen-Anhalt	12	0,16
Thüringen	8	0,04
Sachsen	33	0,06
Total 2007	3.569	0,06
Total 2006	4.306	0,06

2.3.1 Cefquinom-Rückstände in Milch

Nach ordnungsgemäßer Applikation von Cefquinom-Präparaten und bei Einhaltung der Wartezeit wurden von verschiedenen Autoren keine Rückstände oberhalb des MRL-Wertes gemessen (KIETZMANN 2004; KNAPPSTEIN et al. 2005). Nach intramuskulärer Applikation von 1 mg Cefquinom pro kg KGW lagen die Rückstandskonzentrationen zwölf Stunden nach der letzten von fünf Applikationen unter der Nachweisgrenze.

Ein ähnliches Ausscheidungsverhalten zeigte sich nach der intramammären Verabreichung Cefquinom-haltiger Euterinjektoren. Die Ausscheidung von Cefquinom erfolgte nach intramammärer Applikation hauptsächlich über die Milch, eine systemische Resorption des Wirkstoffes war nur sehr gering. Nach zehn Melkzeiten lagen die Werte unter 20 µg/l (EMEA 1995; KNAPPSTEIN et al. 2005; CLINI PHARM 2008; VETIDATA 2008).

KNAPPSTEIN et al. (2005) konnten in ihren Versuchen mit Cobactan® LC-Injektoren bei einer von fünf Milchkühen einen Tag nach Ablauf der Wartezeit Cefquinom-Konzentrationen oberhalb des MRL-Wertes finden. Verantwortlich dafür war eine unsachgemäße Lagerung des Arzneimittels. Bei einer Lagerung der Euterinjektoren über 30 °C, führt dies neben der Veränderung von Farbe und Homogenität der Salbensuspension, zu einer erhöhten Ausscheidung über den MRL-Wert und einer verlängerten Ausscheidungszeit über die vorgesehene Wartezeit von Cefquinom in die Milch hinaus (TEUFEL 2001; KNAPPSTEIN et al. 2005).

Die Melkfrequenz beeinflusste ebenfalls die Ausscheidung von Cefquinom. So war die Ausscheidung nachweisbarer Cefquinom-Rückstände bei dreimal täglich gemolkenen Kühen wesentlich geringer, als bei Tieren, die anderthalbmal oder zweimal täglich gemolken wurden ($p < 0,05$) (JONES und SEYMOUR 1988; KNAPPSTEIN et al. 2005).

2.3.2 Ceftiofur-Rückstände in Milch

Für das Ceftiofur-Präparat Excenel[®] RTU gilt eine Wartezeit von null Tagen für Milch. Einige Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf einen Übergang von Ceftiofur in die Milch (JAGLAN et al. 1992; TYCZKOWSKA et al. 1993; ERSKINE et al. 1995; EMEA 1999; BROWN et al. 2000).

BERENDSEN et al. (2009) postulieren aufgrund ihrer Versuche mit Nierenextrakten, dass möglicherweise bisher unbekannte Metaboliten existieren.

Die Wartezeit von null Tagen gilt nur, wenn das Medikament ordnungsgemäß appliziert wird.

Für eine intramammäre Verabreichung besteht in der EU keine Zulassung, hier ist jedoch mit hohen Rückstandskonzentrationen der unveränderten Muttersubstanz zu rechnen (MÄRTLBAUER o.J.; TYCZKOWSKA et al. 1993; BAUMGARTNER 2002; KERP et al. 2003; SMITH et al. 2004; MAKESWARAN et al. 2005).

KNAPPSTEIN et al. (2005) konnten zudem nachweisen, dass intravenös verabreichtes Ceftiofur bei an *Escherichia coli*-Mastitis erkrankten Tieren zu einer deutlich höheren Ausscheidung des Antibiotikums über die Milch führt, als bei eutergesunden Tieren, denen die gleiche Dosis appliziert wurde. Die Konzentration von Ceftiofur scheint in entzündeten Geweben höher zu sein als im gesunden Gewebe. Die Affinität von Ceftiofur an Plasmaproteine zu binden ist sehr hoch. Bei Entzündungsreaktionen spielen Akute-Phase-Proteine eine wichtige Rolle. Eine Bindung des Wirkstoffs an diese Proteine wird als eine mögliche Erklärung für eine erhöhte Ceftiofur-Konzentration angegeben (OKKER et al. 2002; WASHBURN et al. 2005).

2.4 Nachweisverfahren für Cephalosporine in Milch

Eine Überwachung von Milch bezüglich der Vorschriften der Rückstandshöchstmengen Verordnung (EG) Nr. 470/2009 setzt voraus, dass geeignete Nachweisverfahren zur Qualifizierung und Quantifizierung möglicher antibiotisch wirksamer Rückstände zur Verfügung stehen. Trotz der wissenschaftlichen und technischen Fortschritte der letzten Jahre immer geringere Spuren von Tierarzneimitteln nachzuweisen, wurde bisher kein Testsystem entwickelt, das alle Substanzen auf MRL-Niveau erfassen kann. Deshalb wurden integrierte Nachweissysteme (Abbildung 2.4) entwickelt, die durch eine Abfolge verschiedener Testverfahren eine bestmögliche, wirtschaftliche und schnelle Erfassung aller Substanzen ermöglichen (USLEBER et al. 1994 b; HEESCHEN und SUHREN 1996; SUHREN 2002; KRESS et al. 2007; KIRST 2008).

Auskunft über die Empfindlichkeiten der einzelnen Testverfahren für den Nachweis von Cefquinom und Ceftiofur geben Tabellen 2.4, 2.5 und 2.6.

Die bisherigen Nachweisverfahren lassen sich in den folgenden Kapiteln dargestellt in mikrobiologische Verfahren, Rezeptorbindungstests, enzymatische Tests, immunologische Tests, physikalisch-chemische Nachweisverfahren und sonstige Verfahren einteilen.

2.4.1 Mikrobiologische Verfahren

Mikrobiologische Verfahren sind nach wie vor die wichtigsten Screeningmethoden für den Nachweis von Antibiotika-Rückständen und anderen Hemmstoffen in Lebensmitteln. Für den Nachweis in Milch sind zahlreiche Testsysteme kommerziell erhältlich, deren Testprinzip auf der Hemmung von als Testkeimen eingesetzter Mikroorganismen gegenüber Hemmstoffen beruht. Der bekannteste Testkeim ist *Geobacillus* (ehemals *Bacillus*) *stearothermophilus* var. *calidolactis*. Daneben werden für spezifische Fragestellungen auch *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* und *Streptococcus thermophilus* eingesetzt (MITCHELL et al. 1998; NOUWS et al. 1999; NAVRATILOVA 2008). In einer Testprobe enthaltene Hemmstoffe reduzieren oder verhindern das Wachstum bzw. die Stoffwechselaktivität des Testkeims, was z.B. durch eine ausbleibende Farbveränderung eines dem Nährmedium beigefügten Indikators sichtbar gemacht wird.

Vorteile mikrobiologischer Hemmstofftests sind die einfache Durchführung, die Erfassung einer großen Anzahl von Wirkstoffen und der hohe Probendurchsatz. Sie sind über mehrere Wochen hinweg haltbar und relativ kostengünstig (SUHREN et al. 1996 b, 1998; SUHREN und HEESCHEN 1996).

Nachteilig ist, dass nicht alle antimikrobiellen Substanzen nachgewiesen werden können, bzw. dass die Erfassbarkeit über dem zulässigen MRL-Wert liegt. Gerade für die Erfassung von Cefquinom sind die Nachweisgrenzen der gebräuchlichen mikrobiologischen Verfahren höher als der MRL (ZAADHOF und MÄRTLBAUER 2001; SUHREN und KNAPPSTEIN 2003).

Zudem ist eine direkte Identifizierung eines Wirkstoffes oder eine Abgrenzung zwischen Antibiotika und anderen Hemmstoffen nicht bzw. eingeschränkt möglich.

Veränderungen der Milch in Form von erhöhten Zellzahlen oder veränderte Gehalte an Milchinhaltstoffen können zu Störungen und falsch-positiven Ergebnissen führen (OLIVER et al. 1984; CARLSSON und BJÖRCK 1987; SUHREN und HEESCHEN 1987 b, 1990; VAN EENENNAAM et al. 1993; ANDREW et al. 1997; SCHENCK und CALLERY 1998; NEAVES 1999; ANDREW 2000; FABRE 2006; SUHREN und KNAPPSTEIN 2007).

In der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB sind auch Methoden zur Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe aufgeführt (DAP 2007; DGA 2009).

Methode L 01.00-6 (DGA 2009) beschreibt den Nachweis mittels des Agar-Diffusions-Verfahren-Blättchentests. Beim Blättchentest bildet sich im Agar um Hemmstoff-haltige Proben eine klare Hemmzone. Eingesetzt werden mit der zu untersuchenden Milchprobe getränkte Blättchen, die auf einem mit *Geobacillus stearothermophilus* angereicherten Nährboden bebrütet werden. Die in der Probe enthaltenen Antibiotika diffundieren in den Agar und hemmen das Wachstum des Testkeims. Die Größe des Hemmhofes wird ausgewertet und ist abhängig von Art und Konzentration des Hemmstoffes (ZAADHOF und MÄRTLBAUER 2001).

Eine weitere Methode ist laut L 01.01-5 (DAP 2007) der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT). Das Testprinzip des bekanntesten Vertreters der mikrobiologischen Verfahren beruht auf einer Redoxreaktion des Indikators Brillantschwarz. Beim BRT reduziert der Testkeim *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* das Brillantschwarz von seiner blauschwarzen Farbe in die gelbe Farbe der Reduktionsstufe. Dies ist der Fall, wenn in der hinzugegebenen Probe keine Hemmstoffe enthalten sind, die das Wachstum des Testkeims hemmen. Sind Hemmstoffe in einer Probe enthalten, kommt es nur zu einem geringfügigen oder gar keinem Wachstum des Testkeims, der Redoxindikator Brillantschwarz wird nicht gespalten (KRAACK und TOLLE 1967; AIM 2010; CHR HANSEN o. J.). Der BRT ist von verschiedenen Herstellern kommerziell verfügbar.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden mithilfe eines modifizierten und hinsichtlich seiner Nachweisempfindlichkeit verbesserten BRT-Hemmstofftests von der Firma AiM (Analytik in Milch GmbH, München) untersucht. Die Testsysteme stehen sowohl in Mikrotiterplattenform zur Verfügung, werden aber auch als Einzelröhrchen für den landwirtschaftlichen Unternehmer angeboten.

Die bisher erwähnten Methoden L 01.00-6 (Blättchentest) und L 01.01-5 (BRT) (DAP 2007; DGA 2009) ermöglichen keine Identifizierung und Quantifizierung der Hemmstoffe.

Ein weiteres Beispiel für Testsysteme mit Farbindikatoren ist der Delvotest (Vertrieb durch DSM, Food Specialties; MILKU Tierhygiene GmbH, Bovenden Lenglern). Eingesetzter Testkeim ist ebenfalls *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Der nährstoffreiche Agar enthält den pH-Indikator Bromkresolpurpur. Im Falle einer Hemmstoff-freien Probe verschiebt sich der pH-Wert durch das Wachstum und die Stoffwechselprodukte der Testkeime ins Saure, woraufhin ein Farbumschlag von violett nach gelb zu beobachten ist (JONES und SEYMOUR 1988).

2.4.2 Rezeptorbindungstests

In den vergangenen Jahren wurden speziell für die Untersuchung von Milch eine Reihe von Rezeptorbindungstests zum spezifischen Nachweis von β -Lactamantibiotika entwickelt (SCHLIEPHAKE 1998). Hier werden spezifische Rezeptorproteine für β -Lactamantibiotika

eingesetzt, deren genaue Natur jedoch dem Firmengeheimnis der kommerziellen Anbieter solcher Tests unterliegt.

Rezeptorbindungstests sind einfach in der Durchführung, kostengünstig und liefern schnelle Ergebnisse. Damit die Bindungsreaktionen zwischen Antibiotikum und Rezeptorprotein oder Rezeptorenzym stattfinden kann, sind zur Inkubation Temperaturen von 45-64 °C nötig. Dies setzt einen apparativen Aufwand voraus (Heizblock), wobei dies auch der Fall bei mikrobiologischen Verfahren ist (Heizbad von 64 °C für den BRT).

Ein weiterer Nachteil ist ebenfalls der störende Einfluss originärer Milchinhaltsstoffe, wie z.B. Lysozym und Lactoferrin, auf die Testergebnisse, stark erhöhte Keimzahlen, pH-Wert (<6,4-6,3), somatischer Zellgehalt (>1 Million/ml) und das Laktationsstadium beeinflussen diese ebenfalls (CULLOR 1993; VAN EENENNAAM 1993; ANDREW et al. 1997; SUHREN und REICHMUTH 1998 b; SUHREN und HEESCHEN 1990; ANDREW 2000; SUHREN und KNAPPSTEIN 2007).

Die mittels Rezeptorbindungstests nachweisbaren antimikrobiellen Substanzen beschränken sich auf Penicilline und Cephalosporine, da nur diese Antibiotika an die spezifischen Rezeptorproteine (Penicillin-bindende Proteine) binden können. Für andere Substanzklassen muss ein für diese Substanzen empfindlicher Testkeim eingesetzt werden (SUHREN und HEESCHEN 1987 b).

Zur Untersuchung von Anlieferungsmilch werden in Deutschland vor allem zwei Testsysteme eingesetzt, der SNAP-Test (IDEXX GmbH, Ludwigsburg) und der beta-s.t.a.r. (Chr. Hansen GmbH, Nienburg).

Bei beiden Systemen handelt es sich um kompetitive Tests, d. h. das Messsignal (Farbentwicklung) ist umso niedriger, je höher der Gehalt an Penicillinen/ Cephalosporinen in der Probe ist. Deshalb ist zur Auswertung der Vergleich mit einer Negativkontrolle erforderlich. Beide Tests können entweder visuell mit dem bloßen Auge oder instrumentell (Reflektanz) ausgewertet werden.

Während der SNAP-Test mit einem enzymmarkierten Rezeptor arbeitet, ist beim beta-s.t.a.r. der Rezeptor goldmarkiert. Beide Tests laufen bei Temperaturen von 45 °C ab, daher wird

eine Heizvorrichtung zur Testdurchführung benötigt (ANON. 1994; BELL et al. 1995; JUNG 1996; MITCHELL et al. 1998; SUHREN und REICHMUTH 1998 b; KREUZER 1998; NEAVES 1999; SUHREN und KNAPPSTEIN 2003; FABRE 2006; ZVIRDAUSKIENE und SALMSKIENE 2007; NAVRATILOVA 2008; IDEXX LABORATORIES 2012).

Verschiedene weitere Hersteller bieten ähnliche Testsysteme an, z. B. den Charm Rosa Test (SCHÄLLIBAUM 1986; SUHREN und HEESCHEN 1987 a, b; BRADY und KATZ 1989; CULLOR 1993; MITCHELL et al. 1998; SALTER et al. 2001; NAVRATILOVA 2008; CHARM SCIENCE INC. 2009) oder den Delvo-X-Press (JONES und SEYMOUR 1988; CULLOR 1993; SCANNELLA et al. 1997; MITCHELL et al. 1998; KREUZER 1998; NEAVES 1999; PFLEGER und ZIEGELWANGER 2000; FABRE 2006; NAVRATILOVA 2008).

2.4.3 Enzymatische Tests

Ein enzymatisch-colorimetrisches Testverfahren zum Nachweis von β -Lactamantibiotika ist der Penzymtest, der in verschiedenen Testvarianten vorliegt (Penzym, Penzym S). Das Testprinzip beruht auf einem aus *Streptomyces* gewonnenen Enzym (DD-Carboxypeptidase), welches durch β -Lactamantibiotika inhibiert wird. Eine Milchprobe wird mit der DD-Carboxypeptidase inkubiert. Sind β -Lactame in der Milchprobe enthalten, kann durch die DD-Carboxypeptidase kein D-Alanin hydrolysiert werden und durch dabei freigesetztes Wasserstoffperoxid eine rosa-orange Farbverbindung entstehen. Bei Hemmstoff-positiven Proben verbleibt die gelbe Färbung der Probelösung. Die Menge an oxidiertem Indikator kann in Beziehung zur β -Lactamkonzentration der Milch gesetzt werden, mittels einer mitgelieferten Farbskala erfolgt die Auswertung (WINTERER 1985; JONES und SEYMOUR 1988; DEGELAEN 1994; SUHREN et al. 1996 a; MITCHELL et al. 1998; KREUZER 1998; NEAVES 1999; NAVRATILOVA 2008; NEOGEN EUROPE 2012).

Die verschiedenen Testvarianten unterscheiden sich hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit und der Auswertung (negative Ergebnisse beim Penzym pink-orange und beim Penzym-S pfirsich-orange). Der Penzym-S-Test ist dem Penzym-Test überlegen. So konnten SUHREN et al. (1996 a) mittels dem Penzym-S-Test fünf von sieben β -Lactamantibiotika unterhalb der zulässigen MRL-Werte detektieren. Zum Nachweis von β -Lactamantibiotika für die

Massenuntersuchung in Milchlabors und als Bestätigungstest wird abgeraten (JUNG 1996; WALTE et al. 1996; KNIGHT et al. 2007).

Zusammen mit dem Delvo-X-Press-Test wurde der Penzym-Test von BOISON (2001) nicht als geeignet befunden, β -Lactamantibiotika im Bereich der zulässigen MRL-Werte zu detektieren. JONES und SEYMOUR (1988), heben zwar die nur zwanzigminütige Testdauer hervor, räumen aber Schwierigkeiten bei der Auswertung anhand der Farbveränderung und eine unzureichende Nachweisbarkeit für β -Lactamantibiotika ein. Der MRL-Wert von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Cefquinom kann mittels des Penzym/ Penzym-S-Test nicht erreicht werden (WALTE et al. 1996; KROLL et al. 1999 a, b).

2.4.4 Immunologische Tests

Immunologische Verfahren werden im integrierten Nachweissystem (Abbildung 2.4) im Anschluss an mikrobiologische Verfahren und Rezeptorbindungstests durchgeführt. Sie ermöglichen eine weitere Differenzierung des Wirkstoffs und bei bekannter Identität eine zuverlässige quantitative Bestimmung.

Ausgenutzt wird die Fähigkeit von Antikörpern, spezifische Antigene zu erkennen und zu binden. Gebildete Antigen-Antikörperkomplexe werden durch markierte Reagenzien sichtbar gemacht. Bei der Untersuchung von Lebensmitteln werden Rückstände fast ausschließlich mit bekannten Antikörpern nachgewiesen, die mit Markern versehen werden. Als Marker dienen im Enzymimmunoassay (EIA) Enzyme, wie die Meerrettichperoxidase oder die Alkalische Phosphatase, und im Radioimmunoassay (RIA) radioaktive Isotope. Auch fluoreszierende Substanzen kommen als Marker zum Einsatz (FIA) (NEWSOME 1986; USLEBER et al. 1994 b; MITCHELL 1998; MÄRTLBAUER 2004; NAVRATILOVA 2008).

Bei denen in dieser Arbeit angewendeten Untersuchungsverfahren handelt es sich um enzymimmunochemische Tests, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

Sowohl der EIA zum Nachweis von Cefquinom, als auch der EIA zum Nachweis von DFC werden als indirekter kompetitiver ELISA durchgeführt.

Dazu werden in einem ersten Schritt Mikrotiterplatten mit Antigen-Protein-Konjugat beschichtet. Das Antigen-Protein-Konjugat heftet an das Trägermaterial (Mikrotiterplatte) und bildet so die Festkörperphase. Um noch freie Proteinbindungsstellen auf dem Trägermaterial abzusättigen, wird eine Casein-Lösung aufgebracht.

Anschliessend wird die zu untersuchende Probe mit freiem Antigen und spezifischen Antikörper (Kaninchen-Antiserum) in die Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben. Das freie Antigen der Probe konkurriert mit den Bindungsstellen der Festkörperphase um die speziellen Antikörper des Kaninchenserums. Umso größer die Menge an freiem Antigen ist, desto geringer ist die Bindung der spezifischen Antikörper an die Festkörperphase. Es folgt ein Waschschrift zum Entfernen ungebundener Reagenzien. Daraufhin wird ein Konjugat aus enzymmarkierten Antikörpern (hier Anti-Kaninchen-IgG-HRP, d. h. mit Meerrettichperoxidase markierte Antikörper, die gegen Immunglobuline der Tierart (Kaninchen), von der die spezifischen Antikörper stammen gerichtet sind) auf die Platte gegeben. Diese enzymmarkierten Sekundäntikörper binden an die spezifischen Antikörper, die an der Festkörperphase der Platte gebunden haben. Nach einer Inkubationszeit und einem Waschschrift wird Substrat zugegeben, dass die an die Festkörperphase gebundenen Antikörper durch Substratumsatz des Enzyms sichtbar macht. Der Substratumsatz ist demnach umgekehrt proportional zur freien Antigenmenge in der Probe (USLEBER 1991; ROSE et al. 1995; STRASSER et al. 2001; THAL 2006; MEIER 2008).

Beispiele für kommerziell erhältliche immunochemische Analyseverfahren für den Nachweis von β -Lactamantibiotika in Milch sind der LacTek-Test und der Parallax™-Test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA) (NAVRATILOVA 2008).

Der LacTek-Test ist ein kompetitiver Enzymimmunrezeptor-Test im Röhrchenformat. Neben dem herkömmlichen LacTek-Test für Penicilline, ist ein spezieller LacTek-Test zum Nachweis von Ceftiofur erhältlich (ESCOBAR o. J., JUNG 1996; MITCHELL et al. 1999; NEAVES 1999; BELL und SCANNELLA 2007). Nach einer neueren eigenen Recherche scheint der LacTek-Test jedoch nicht mehr kommerziell verfügbar zu sein.

Beim Parallax-Test™ handelt es sich um einen Fluoreszenzimmunoassay (FIA). Er wird in verschiedenen Varianten angeboten, unter anderem auch als Parallax™ Ceftiofur Assay (NEAVES 1999; HUTH et al. 2002; OKERMANN et al. 2003; NAVRATILOVA 2008;

IDEXX LABORATORIES 2001). Die Nachweisgrenzen der kommerziell erhältlichen Testverfahren sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 aufgeführt.

Die Nachweisbarkeit des von THAL (2006) entwickelten immunchemischen Nachweisverfahrens für Cefquinom liegt bei 1-2 ng/ml.

Der von MEIER (2008) entwickelte EIA kann Ceftiofur bzw. DFC bis zu einer Konzentration von 1-3 ng/ml (Ceftiofur) und 50-100 ng/ml (DFC) nachweisen (KERP et al. 2004).

2.4.5 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

Physikalisch-chemische Nachweisverfahren bieten den Vorteil geringe Rückstandsmengen zu spezifizieren und zu quantifizieren. Sie sind als Multimethoden in der Lage möglichst viele Verbindungen zu erfassen (JACKMAN et al. 1991; BECKER et al. 2004; FABRE 2006).

Die häufigsten Methoden zur Quantifizierung von β -Lactamantibiotika sind aufgrund der ausgeprägten UV-Absorptionseigenschaften (UV-Max 260-290 nm) der Cephalosporine chromatographische Verfahren mit UV-Detektion. Das Grundprinzip dieser Verfahren ist eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase.

Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Flüssigkeitschromatographie (Liquid chromatography, LC). Dabei wird eine flüssige Probe unter hohem Druck über eine stationäre Phase (Säule) transportiert. Entscheidend ist die Löslichkeit des zu untersuchenden Stoffes in der flüssigen Phase. Sind die Substanzen voneinander getrennt, erfolgt die Detektion bzw. Messung.

HPLC-Verfahren (high performance liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie) mit UV- oder Fluoreszenzdetektion werden in den letzten Jahren immer mehr von flüssigkeitschromatographischen Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion (LC/MS) ergänzt (FABRE 2006).

Alle genannten Verfahren finden bisher keine Anwendung in der Routinediagnostik, sondern dienen als Referenzverfahren. Gründe dafür sind der hohe apparative Aufwand, die

Bereitstellung von qualifiziertem Fachpersonal, der Zeitaufwand und der daraus resultierende hohe Kostenfaktor (USLEBER et al. 1994 a; MITCHELL et al. 1998; OKERMAN et al. 2003).

In Tabelle 2.6 sind einige in der Literatur beschriebene physikalisch-chemische Verfahren für den Nachweis von Cefquinom, Ceftiofur und Ceftiofur-Metaboliten sowie deren Nachweisgrenzen aufgeführt.

2.4.6 Sonstige Verfahren

1995 entwickelten CUTTING et al. (1994) ein Agarosegel-Elektrophorese-Verfahren in Kombination mit einem Indikatoragar aus *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis* zum Nachweis von sechs β -Lactamantibiotika in Milch. Ceftiofur ist mittels dieses Verfahrens ab Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachweisbar (SCHENCK und CALLERY 1998).

Da bisher weiterhin die Notwendigkeit eines integrierten Ansatzes besteht, mit denen eine bezahlbare Methode zur Qualifizierung und Quantifizierung von Wirkstoffen auf Ebene der Rückstandshöchstwerte erreicht werden kann, setzen neuere Forschungen auf den Einsatz von Biosensoren. In Zusammenarbeit des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der LMU München und des Lehrstuhls für Analytische Chemie im Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der TU München wurde ein neues BioSensor-System zum Nachweis von Antibiotika in Milch entwickelt (Munich-Chip-Readersystem MCR3). In einem Validierungsprojekt des Milchprüfing Bayern e.V. wird die Praxistauglichkeit des MCR3 überprüft und evaluiert (BAUMGARTNER 2009; BAUMGARTNER et al. 2010). BAUMGARTNER et al. (2010) halten einen Einsatz des Munich-Chip-Readersystems MCR 3 in Ergänzung zu bisherigen Routinemethoden des integrierten Nachweissystems als durchaus sinnvoll.

Biosensor-Analysen beruhen darauf, dass Bindungspartner wie Antikörper, Enzyme oder Zellen an einen Messwandler (Transducer) gebunden werden und die zu analysierende Substanz (Analyt) spezifisch binden. Hat der Bindungspartner die zu analysierende Substanz gebunden, wandelt der Transducer dies in ein messbares, elektrisches Signal um. Im Fall des

MCR 3 misst eine CCD-Kamera eine Antigen-Antikörper-Reaktion in einem Micro-Array-System mit Chemilumineszenz als Signal (CACCIATORE 2005; BAUMGARTNER 2009)

Tabelle 2.4: Nachweisgrenzen kommerziell erhältlicher Testverfahren (mikrobiologische Verfahren und Rezeptortests) für den Nachweis von Cefquinom in Milch.

Nachweisverfahren	Nachweisgrenze Cefquinom µg/kg	Referenz
BRT	80	NOUWS et al. (1999)
BRT	150	KNAPPSTEIN et al. (2005)
BRT	150-250	SUHREN und KNAPPSTEIN (2007)
BRT	100-200	KLOTH (2011)
BRT-MRL-Suchtest	40-60	CHR. HANSEN GMBH (o.J.)
BRT-AS	250	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
BRT-AS-Brillant	100-150	SUHREN und KNAPPSTEIN (2007)
BRT-AS-Special	250	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
BRT-AS-Special	90	GDCh (2002)
BRT-AS-Special	>MRL-Wert	SUHREN (2002)
BRT-AS-Special	200->250	SUHREN und KNAPPSTEIN (2007)
Delvo-X-Press	40	KROLL et al. (1999 a, b)
Delvo SP	250	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
Delvo SP	100	KNAPPSTEIN et al. (2005)
Delvo SP	100-250	SUHREN und KNAPPSTEIN (2007)
βeta-Star	10	KROLL et al. (1999 a, b)
βeta-Star	12,5	KNAPPSTEIN et al. (2005)
βeta-Star	10-15	SUHREN und KNAPPSTEIN (2007)
SNAP-Test Beta-Lactam	17,5-27,5	SUHREN und REICHMUTH (1998 a, b)
SNAP-Test Beta-Lactam	20	KROLL et al. (1999 a, b)
SNAP-Test Beta-Lactam	23-27	GDCh (2002)
SNAP-Test Beta-Lactam	≤MRL-Wert	SUHREN (2002)
CHARM-Test	20	KROLL et al. (1999 a, b)
CHARM-II-Test	20	SUHREN und REICHMUTH (1998 a); CHARM SCIENCE INC. (2009)
CHARM-II-Test	10-20	GDCh (2002)
ROSA-MRL Beta-Lactam	15-25	CHARM SCIENCE INC. (2009)
Penzym	50	WALTE et al. (1996)
Penzym	40	KROLL et al. (1999 a, b)
Penzym-S	45	WALTE et al. (1996); SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
Penzym-S	>MRL-Wert	SUHREN (2002)

Tabelle 2.5: Nachweisgrenzen kommerziell erhältlicher Testverfahren (mikrobiologische Verfahren bzw. Rezeptortests) für den Nachweis von Ceftiofur in Milch.

Nachweisverfahren	Nachweisgrenze Ceftiofur µg/kg	Referenz
BRT	70-100	CHR. HANSEN GMBH (o. J.)
BRT	<MRL-Wert	HEESCHEN und SUHREN (1996)
BRT	>60	MOLLENHAUER (1999)
BRT	30	NOUWS et al. (1999)
BRT-MRL-Suchtest	70-100	CHR. HANSEN GMBH (o. J.)
BRT-AS	150	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
BRT-AS	100	MOLLENHAUER (1999)
BRT-AS-Special	100	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
BRT-AS-Special	30-100	MOLLENHAUER (1999)
BRT-AS-Special	<MRL-Wert	SUHREN (2002)
Delvo-X-Press	2-4	SCANNELLA et al. (1997)
Delvo-X-Press	4-8	KREUZER (1998); SUHREN und REICHMUTH (1998 a); MOLLENHAUER (1999); NEAVES (1999)
Delvo-X-Press	50	KROLL et al. (1999 a, b)
Delvo SP	<MRL-Wert	HEESCHEN und SUHREN (1996)
Delvo SP	100	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
Delvo SP	50-75	MOLLENHAUER (1999)
Delvotest-P	nicht nachweisbar	JAGLAN et al. (1992)
Delvotest-P	nicht nachweisbar	EMEA (1999)
βeta-Star	100	KROLL et al. (1999 a, b)
βeta-Star	100-150	MOLLENHAUER (1999)
βeta-Star	75-150	NEAVES (1999), GDCh (2002)
βeta-Star	>500	ABOUZIED et al. (2009)
SNAP-Test Beta-Lactam	50	ANON. (1994); BELL et al. (1995); KROLL et al. (1999 a, b)
SNAP-Test Beta-Lactam	6	KREUZER (1998); MOLLENHAUER (1999)
SNAP-Test Beta-Lactam	<MRL-Wert	SUHREN (2002)
SNAP-Test Beta-Lactam	8-10	SCHNEIDER et al. (1994)
SNAP-Test Beta-Lactam	3,5-5,5	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
SNAP-Test Beta-Lactam	5-6	GDCh (2002)
SNAP-Test Beta-Lactam	12	IDEXX LABORATORIES (2011)

Fortsetzung: Tabelle 2.5:

CHARM-II-Test	25	SUHREN und REICHMUTH (1998 a)
CHARM-II-Test	40	NEAVES (1999); CHARM SCIENCE INC (2009)
CHARM-II-Test	<MRL-Wert	SUHREN (2002)
CHARM-II-Test	5-10	GDCH (2002)
CHARM-Test	20	KREUZER (1998)
CHARM-Test	50	KROLL et al. (1999 a, b)
CHARM-Test	46	SALTER et al. (2001)
ROSA MRL-3-Beta- Lactam Test	10-20	CHARM SCIENCE INC. (2009)
ROSA MRL-Beta- Lactam Test	30-60	CHARM SCIENCE INC. (2009)
LacTek Ceftiofur	≤MRL-Wert	MUSSER und ANDERSON (1999)
LacTek β-Lactam	50	SCHNEIDER et al. (1994)
LacTek β-Lactam	>MRL-Wert	NEAVES (1999)
Penzym	90	SUHREN et al. (1996); WALTE et al. (1996); SUHREN und HEESCHEN (1998 a)
Penzym	100	KROLL et al. (1999 a, b)
Penzym	80	MUSSER und ANDERSON (1999); NEOGEN EUROPE (2012)
Penzym	40-70	NEAVES (1999)
Penzym	<MRL-Wert	SUHREN (2002)
Penzym-S	70	SUHREN et al. (1996 a); WALTE et al. (1996), SUHREN und HEESCHEN (1998 a)
Penzym-S	20-40	GDCh (2002)
Parallux β-Lactam	33,7	GDCh (2002), HUTH et al. (2002)

Tabelle 2.6: Nachweisgrenzen physikalisch-chemischer Testverfahren für den Nachweis von Cefquinom, Ceftiofur und Ceftiofurmetaboliten (DFC).

Nachweisverfahren	nachgewiesene Substanz	Nachweisgrenzen in µg/kg	Referenz
HPLC-UV	Cefquinom	7	SØRENSEN und SNOR (2000)
LC-UV	Cefquinom	2-3	SUHREN und KNAPPSTEIN (2003)
LC-MS/MS	Cefquinom	10-30	BECKER et al. (2004)
HPLC-UV	Cefquinom	<2	KNAPPSTEIN et al. (2005)
LC-ES-MS	Ceftiofur und Metabolite	50	TYCZKOWSKA et al. (1993)
LC-ESP-MS	Ceftiofur	3-5	STRAUB et al. (1994)
LC-UV	Ceftiofur	2-5	MOATS und HARIK-KHAN (1995)
HPLC-UV	Ceftiofur	0,5	ROSE et al. (1995)
LC-MS/MS	Ceftiofur	50	SCHENCK und CALLERY (1998)
LC-UV	Ceftiofur	2,5-4	SCHERMERHORN et al. (1998)
HPLC-UV	Ceftiofur und Metabolite	k. A.	STANKER et al. (1998)
HPLC	DCD	k. A.	EMEA (1999)
HPLC-UV	Ceftiofur	7	SØRENSEN und SNOR (2000)
LC-MS/MS	Ceftiofur	0,4	HOLSTEGE et al. (2002)
LC-MS/MS	Ceftiofur-Metabolite	96,1-101,2	BECKER et al. (2003)
LC-MS/MS	Ceftiofur und Metabolite	166-239	MAKESWARAN et al. (2005)

Abkürzungen:

DCD	= Desfuroylceftiofur Cystein Disulphid
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

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Tiere, Materialien und Geräte

3.1.1 Tiere

Die Gewinnung von Viertelsgemelksproben nach therapeutischer Applikation sowohl für die Untersuchungen zur Ausscheidung von Cefquinom als auch von Desfuroylceftiofur, wurden bei insgesamt 12 Milchkühen (Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3) des familieneigenen Betriebes GbR Heck-Steffen, Großlittgen, Rheinland-Pfalz durchgeführt.

Der Betrieb umfasst circa 160 Milchkühe der Rassen Holstein-Friesian Schwarzbunt, Braunvieh sowie Kreuzungen aus diesen Rassen.

Die Tiere werden zweimal täglich in einem Doppel-Zwölfer-Side-by-Side-Melkstand gemolken, die Applikation der Medikamente erfolgte im Rahmen dieser Melkzeiten. Von jedem Tier wurde vor Beginn der Behandlung jeweils eine Negativ-Milch (Gemelk Nr. 1) gewonnen.

Die Tiere werden ganzjährig im Boxenlaufstall ohne Weidegang gehalten, die Fütterung erfolgt als TMR (Totale Mischration). Die durchschnittliche aufgelaufene Milchleistung der behandelten Tiere im Jahr 2008 variierte zwischen 650 kg Milch und 11.797 kg Milch. Das Alter der Tiere reichte von knapp zwei Jahren bis sechs Jahren.

Fünf Tiere waren im Zeitraum von April bis August 2008 an einer bakteriell bedingten akuten klinischen Mastitis erkrankt und wurden daraufhin systemisch und lokal mit Cefquinomhaltigen Präparaten behandelt.

Zwei klinisch gesunde Tiere wurden mit einem Cefquinom-Präparat trocken gestellt, die Probengewinnung erfolgte im April 2008.

Insgesamt fünf Milchkühe wurden im Zeitraum von Juni bis September 2008 mit Ceftiofur therapiert, davon in vier Fällen aufgrund eines Panaritiums und in einem Fall aufgrund einer Endometritis.

Detaillierte Angaben zu den Tieren sowie zur Behandlung mit Cefquinom bzw. Ceftiofur sind in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Zusammenstellung verschiedener Kenngrößen und Leistungsparameter der mit Cefquinom behandelten Kühe.

Parameter	Kuh A	Kuh B	Kuh C	Kuh D	Kuh E
Rasse	HSB x B	HSB x B	HSB x HSB	HSB x HSB	HRB x HSB
Alter (Jahre/ Geburtsdatum)	5/ 21.08.2002	3/ 22.01.2005	4/ 28.02.2004	6/ 02.01.2002	3/ 28.06.2005
letzte Kalbung	09.12.2007	10.04.2008	12.11.2007	22.11.2007	21.05.2008
Anzahl der Laktationen	4	2	3	5	2
tägliche Milchleistung (kg) (Durchschnittswert der zwei letzten Milchkontrollen)	38,1	34,5	34,0	36,0	43,0
Milchleistung 2008 (Melktage/ Milch kg)	335/ 11.797	313/ 7.952	334/ 11.368	324/ 13.470	307/ 10.032
Grund der Behandlung	Mastitis VL	Mastitis HL	Mastitis VL	Mastitis VR	Mastitis HL
Zeitraum der Probennahme	13.04.- 24.04.08	14.04.- 25.04.08	15.05.- 25.05.08	13.06.- 23.06.08	10.07.- 21.07.08

Art und Dauer der Behandlung
 einmal täglich 625 mg Cefquinom i.m. über 3 Tage und zweimal täglich
 75 mg Cefquinom intramammär ins betroffene Euterviertel über 3 Tage

Abkürzungen: Rasse: Muttertier x Vater-tier HRB = Holstein Friesian Rotbunt
 HSB = Holstein-Friesian Schwarzbunt B = Braunvieh

Tabelle 3.2: Zusammenstellung verschiedener Kenngrößen und Leistungsparameter der mit Cefquinom trocken gestellten Tiere.

Parameter	Kuh A _{TS}	Kuh B _{TS}
Rasse	HSB x HSB	HSB x HSB
Alter (Jahre/ Geburtsdatum)	2/ 27.05.2005	3/ 20.03.2005
letzte Kalbung	16.04.2008	20.04.2008
Anzahl der Laktationen	2	2
tägliche Milchleistung (kg)	39,2	39,1
Milchleistung 2008 (Melktage/ Milch kg)	307/ 8.466	303/ 8.025
Dauer der Trockenstehperiode (in Tagen)	61	77
Zeitraum der Probennahme	18.04.- 21.04.08	23.04.- 27.04.08
Art und Dauer der Behandlung	einmal 4 x 150 mg Cefquinom intramammär	

Abkürzungen: Rasse: Muttertier x Vattertier
 HSB = Holstein-Friesian Schwarzbunt
 TS = Trockensteller

Tabelle 3.3: Zusammenstellung verschiedener Kenngrößen und Leistungsparameter der mit Ceftiofur behandelten Kühe.

Parameter	Kuh F	Kuh G	Kuh H	Kuh I	Kuh J
Rasse	HSB x B	Kreuzung x B	HSB x B	HSB x B	HSB x HSB
Alter (Jahre/ Geburtsdatum)	2/ 04.10.2005	1/ 26.06.2006	3/ 16.06.2005	2/ 02.10.2005	2/ 08.01.2006
letzte Kalbung	10.06.2008	23.05.2008	29.07.2008	08.08.2008	01.09.2008
Anzahl der Laktationen	2	1	1	2	1
tägliche Milchleistung (kg)	21,1	23,0	23,8	32,0	22,4
Milchleistung 2008 (Melktage/ Milch kg)	350/ 7.611	130/ 2.722	63/ 1.628	322/ 9.058	29/ 650
Grund der Behandlung	Endometritis	Panaritium	Panaritium	Panaritium	Panaritium
Zeitraum der Probennahme	13.06.- 19.06.08	22.06.- 28.06.08	08.08.- 14.08.08	30.08.- 05.09.08	06.09.- 12.09.08
Art und Dauer der Behandlung	01.06.:Trockenstellen 4 x 150mg Cefquinom 13.06.:Calcium,NaCL, Flunixin, B-Vitamine, Dexamethason				
	einmal täglich 750 mg Ceftiofur s.c. über 3 Tage				

Abkürzungen: Rasse: Muttertier x Vätertier
 HSB = Holstein-Friesian Schwarzbunt B= Braunvieh

3.1.2 Eingesetzte Präparate und Beschreibung der Applikation

3.1.2.1 Cefquinom

Für die Behandlung der fünf Tiere mit klinischer Mastitis wurden zwei verschiedene Cefquinom-haltige Präparate eingesetzt:

- (1) Cobactan[®] 2,5% Injektionssuspension sowie
- (2) Cobactan[®] LC Euterinjektoren.

Beide Präparate wurden gleichzeitig in einer Kombinationstherapie verabreicht.

- (1) Kurzcharakteristik Cobactan[®] 2,5% Injektionslösung (Intervet, Gebrauchsinformation, Stand Februar 2004)

Zusammensetzung: 1 ml enthält 29,64 mg Cefquinomsulfat,
entspricht 25 mg Cefquinom

Empfohlene Dosierung: 1 mg Cefquinom/kg KGW, einmal täglich an 2 aufeinander
folgenden Tagen, intramuskulär

Wartezeit: Essbare Gewebe: 5 Tage
Milch: 1 Tag

- (2) Kurzcharakteristik Cobactan[®] LC (Intervet, Gebrauchsinformation, Stand Mai 2004)

Zusammensetzung: 1 Injektor zu 8 g enthält 75 mg Cefquinom
als Cefquinom-Sulfat

Empfohlene Dosierung: 75 mg Cefquinom (1 Injektor zu 8 g) pro Viertel
alle 12 Stunden an jeweils drei aufeinander folgenden
Melkzeiten, intramammär

Wartezeit: Essbare Gewebe: 4 Tage
Milch: 5 Tage

Die Diagnose akute klinische Mastitis (Mastitis catarrhalis acuta) wurde jeweils aufgrund der visuellen Veränderungen von Eutergewebe und Milchsekret gestellt. Nach dem Ermelken einer Negativkontrolle (Gemelk Nr. 1), wurden jeweils 25 ml der 2,5% Cobactan[®]-

Injektionslösung (entspricht 625 mg Cefquinom/Tier/Tag) intramuskulär appliziert und im Anschluss an den Melkvorgang je ein Euterinjektor Cobactan[®] LC (entspricht zweimal täglich je 75 mg Cefquinom/Tier) in das betroffene Euterviertel instilliert. Die intramuskuläre Applikation erfolgte einmal täglich über einen Zeitraum von drei Tagen hinweg, die intramammäre Applikation erfolgte zweimal täglich über einen Zeitraum von drei Tagen hinweg (6 Injektoren je behandelte Kuh).

(3) Kurzcharakteristik Cobactan[®] DC (Intervet, Gebrauchsinformation, Stand Januar 2005)

Zusammensetzung:	1 Euterinjektor mit 3 g enthält 150 mg Cefquinom als Cefquinomsulfat
Empfohlene Dosierung:	150 mg Cefquinom (1 Injektor) unmittelbar nach dem letzten Ausmelken pro Viertel, einmalige intramammäre Anwendung
Wartezeit:	Essbare Gewebe: 2 Tage Milch: 1 Tag nach dem Abkalben, wenn die Trockenstehzeit mehr als 5 Wochen beträgt; 36 Tage nach der Behandlung, wenn die Trockenstehzeit 5 Wochen oder weniger beträgt.

Zusätzlich wurden Milchproben von zwei klinisch gesunden, mit Cobactan[®] DC trockengestellten Kühen im Anschluss an die Kalbung gewonnen. Untersucht wurde das Ausscheidungsverhalten von Cefquinom nach Beendigung der Trockenstehperiode. Nach dem letzten Ausmelken wurde in jedes Euterviertel ein Injektor a 150 mg Cefquinom eingebracht. Die Trockenstehperiode betrug 61 Tage (Kuh A_{TS}) bzw. 77 Tage (Kuh B_{TS}).

3.1.2.2 Ceftiofur

Für die Behandlung der Tiere mit den Diagnosen Panaritium (n= 4) bzw. Endometritis (n=1) wurden jeweils das Präparat Excenel[®] RTU 50 mg/ml eingesetzt.

(1) Kurzcharakteristik Excenel[®] RTU 50 mg/ml (Pfizer, Gebrauchsinformation, Stand Juli 2007)

Zusammensetzung: 1 ml Injektionssuspension enthalten 57,14 mg
Ceftiofurhydrochlorid, entspricht 50 mg Ceftiofur

Empfohlene Dosierung: 1 mg Ceftiofur pro kg KGW an 3 (Panaritium) bzw.
5 (Metritis) aufeinander folgenden Tagen, subkutan

Wartezeit: Essbare Gewebe: 8 Tag
Milch. 0 Tage

Vier der fünf Tiere wurden aufgrund der Diagnose Panaritium jeweils mit 15 ml Excenel[®] RTU 50 mg/ml (entspricht 750 mg/Tier/Tag, subkutan) einmal täglich an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt.

Das an einer Endometritis erkrankte Tier wurde nach dem gleichen Schema behandelt. Aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes erhielt die Kuh am ersten Tag der Behandlung zusätzlich 500 ml Calcium (Calciveyxol 38, Fa. Vexy-Pharma), 1 Liter NaCl 0,9% (Fa. Braun), 25 ml Flunixin-Meglumin (Paraflunixin Injektionslösung, Fa. IDT), 10 ml B-Vitamine (Be-Complex, Fa. medistar) und 15 ml Dexamethason (Dexamethason Injektionslösung ad. us. vet., Fa. Medistar). Das Tier hatte drei Tage vor Therapiebeginn verkalbt. Die Trockenstehperiode betrug lediglich 10 Tage (13 Tage bis Therapiebeginn). Als Präparat zum Trockstellen wurde Cobactan[®] DC (3.1.2.1 (3)) eingesetzt.

3.1.3 Chemikalien und Biochemika

Aceton	(Merck KGaA, 1.00013)
Albumin bovine serum, min 99%, Bovines Serumalbumin (BSA)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A0281-250 MG)
Casein sodium salt from bovine milk, Casein-Natriumsalz	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-8654)
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)- Carbodiimid	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, E-7750)
Glucoseoxidase (GOx)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G-7016)
Magermilchpulver	(Merck KGaA, 1.5363)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Schwefelsäure (95-97%)	(Merck KGaA, 1.00731)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KGaA, 1.07209)

3.1.4 Antibiotika

Cobactan [®] i.v. 4,5% Pulver (Wirkstoff Cefquinom)	(Intervet)
Excenel [®] 4 g (Wirkstoff Ceftiofur)	(Pfizer)
Desfuroyl-Ceftiofur	(U.S. Biological)

3.1.5 Puffer und Lösungen

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

Casein-Lösung:

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

2% Casein-PBS-Lösung (20 g Natriumcaseinat/1 PBS)

Magermilchpulverlösung:

10% Magermilchpulver in PBS (5 g Magermilchpulver und 50 ml PBS)

10% Magermilchpulver in Aqua dest. (5 g Magermilchpulver und 50 ml Aqua dest.)

PBS:

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

TMB= Tetramethylbenzidinlösung:

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

Enzymsubstrat-/Chromogenlösung:

10 ml Wasserstoffperoxidlösung und 500µl Tetramethylbenzidinlösung

Waschlösung:

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

3.1.6 Immunreagenzien

Anti-Cefquinom:

Antiserum Kaninchen 17, Pool 20-68 + Cefquinom-GOx-Konjugat

(ungefällt vom 24.11. 2004)

(THAL 2006)

Anti-Ceftiofur:

Antiserum Kaninchen 06, Woche 17½ + Ceftiofur-BSA-Konjugat

(MEIER 2008)

Schwein-Anti-Kaninchen IgG-HRP

(Meerrettichperoxidasekonjugat)

(DAKO A/S, P 0217)

3.1.7 Probenmaterial

Für die Vergleichsproben im Enzymimmuntest und auch für die Negativkontrollen des BRT-P wurde Hemmstoff-freie, pasteurisierte und homogenisierte Vollmilch mit einem Fettgehalt von 3,8% verwendet. Vor jedem Testeinsatz wurde die Vollmilch durch fünfzehnminütiges Zentrifugieren bei 3000/min und einer Temperatur von 4 °C entfettet.

3.1.8 Geräte

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH)
Magnetrührer mit Heizung RCT basic	(IKA [®] -Werke GmbH & Co KG)
Mehrstellenmagnetrührer	(IKA [®] -Werke GmbH & Co KG)
Mikrotiterplatten Nunc Immuno Plate 439454	(Nunc GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)
Pasteur-Pipetten, Glas	(VWR International GmbH)
Rührgerät Heidolph MR 3000	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)
Variable Mehrkanalpipette	
10-100 µl, 30-300 µl	(Eppendorf AG)
Variable Pipetten 0,5-10 µl	(Eppendorf AG)
Variable Pipetten 10-100 µl	(Eppendorf AG)
Variable Pipetten 100-1000 µl	(Eppendorf AG)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries, Inc.)
Waage, FKB	(Kern & Sohn GmbH)
Waage, Satorius BP 4100 S	(Satorius AG, Göttingen)
Wasserbad	(Köttermann)
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH)

3.1.9 Sonstige Materialien

Rida Win-Software	(r-Biopharm, GmbH)
beta-s.t.a.r	(Chr. Hansen GmbH)
SNAP [®] Beta-Laktam Test	(IDEXX GmbH)
BRT-P-ESL	(AiM, Analytik in Milch GmbH)

3.2 Methodik

3.2.1 Probengewinnung und Probenaufbereitung

Vor Behandlungsbeginn wurde von allen Kühen jeweils eine Negativ-Milch (Gemelk Nr. 1) gewonnen. Daraufhin folgte die Applikation der jeweiligen Antibiotika, die zweite Probe (Gemelk Nr. 2) wurde in der ersten Melkzeit nach Behandlungsbeginn entnommen. Die weitere Probengewinnung erfolgte zu den jeweiligen morgendlichen und abendlichen Melkzeiten. Nach dem Anmelken und Reinigen der Euterviertel wurde aus jedem Viertel je ein 14 ml Plastikröhrchen mit Milch befüllt. Im Anschluss an den Melkvorgang wurde zusätzlich eine Sammelprobe aller vier Viertel aus der in die Milchkanne gemolkenen Milch in ein weiteres Plastikröhrchen gefüllt.

Die Probeentnahmeschemata sind in den Abbildungen 3.1 und 3.2 nochmals ersichtlich.

Bei den fünf Tieren (Kühe F, G, H, I und J), die mit Excenel[®] RTU parenteral behandelt wurden, wurde lediglich nur eine Sammelprobe pro Melkzeit gewonnen. Die Probengewinnung wurde in allen Fällen zwei bis drei Tage über die für das jeweilige Präparat vorgeschriebene Wartezeit hinaus durchgeführt.

Alle Milchproben wurden unmittelbar bei -18 °C tiefgefroren. Die Untersuchungen der im Zeitraum von April bis September 2008 gewonnenen Milchproben erfolgten maximal zwei Wochen nach Probennahme.

Zur enzymimmunologischen Untersuchung und zur Untersuchung mittels BRT-P wurden die Milchproben aufgetaut und durch Zentrifugation (15 Minuten bei ca. 1500 x/g) und anschließendem Entfernen des Rahms grob entfettet.

Für die beiden Tiere (Kühe A_{TS} und B_{TS}), die mit Cobactan[®] DC trockengestellt worden waren, erfolgte die erste Milchprobenentnahme in der ersten Melkzeit nach der Kalbung (Gemelk Nr. 1). Viertelgemelksproben und Sammelprobe wurden über einen Zeitraum von vier Tagen gewonnen.

Insgesamt 699 Viertelgemelksproben wurden mittels der Testsysteme EIA, BRT-P und β -s.t.a.r. untersucht. Davon wurden 329 Viertelgemelksproben der 12 Milchkühe (Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3) im enzymimmunologischen Verfahren eingesetzt und ausgewertet, 252 Proben im BRT-P und 118 Proben im Rezeptorbindungstest.

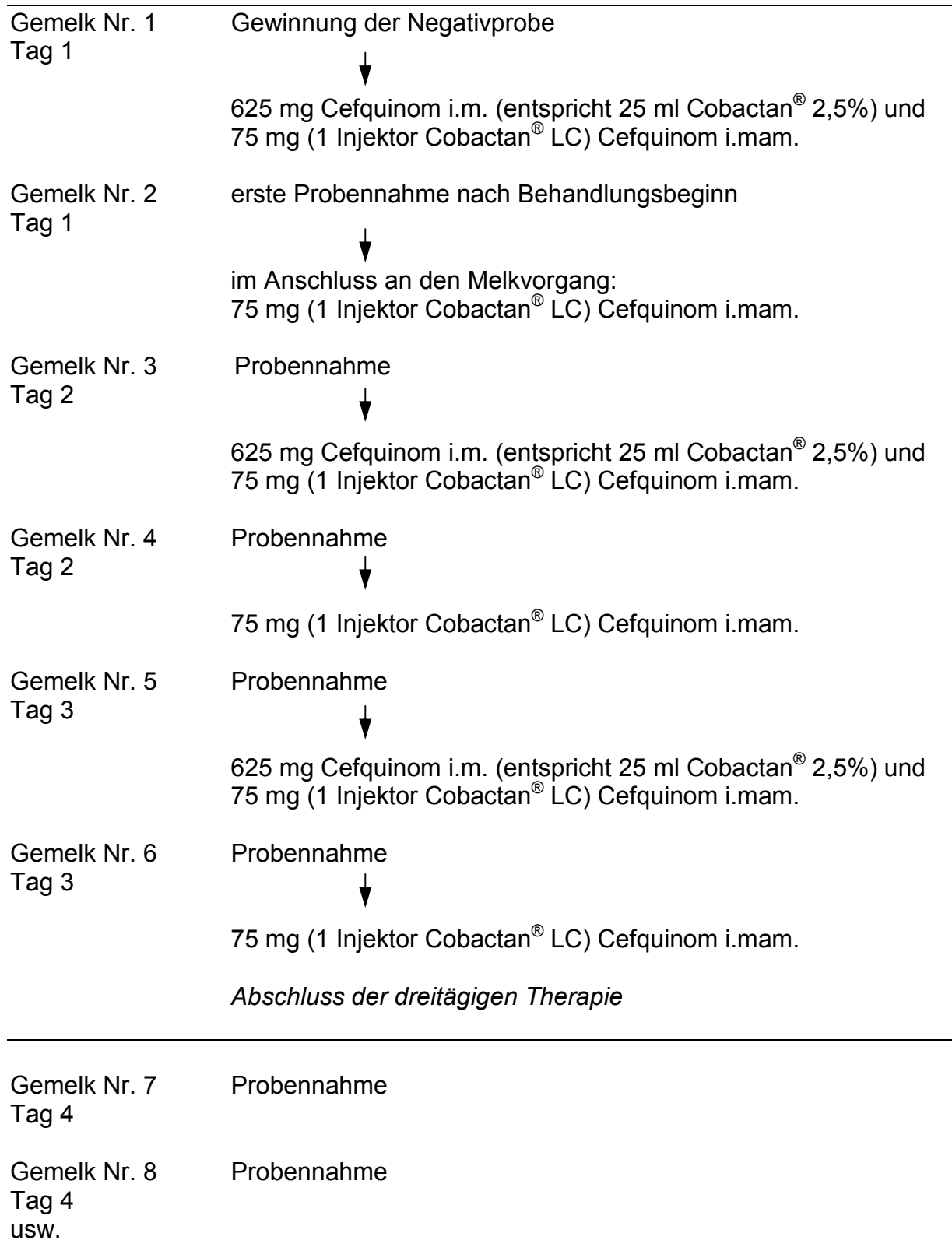


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Behandlungsfrequenz der an Mastitis erkrankten Kühe A, B, C, D und E mit Cefquinom, sowie Zeitpunkte der Probennahme.

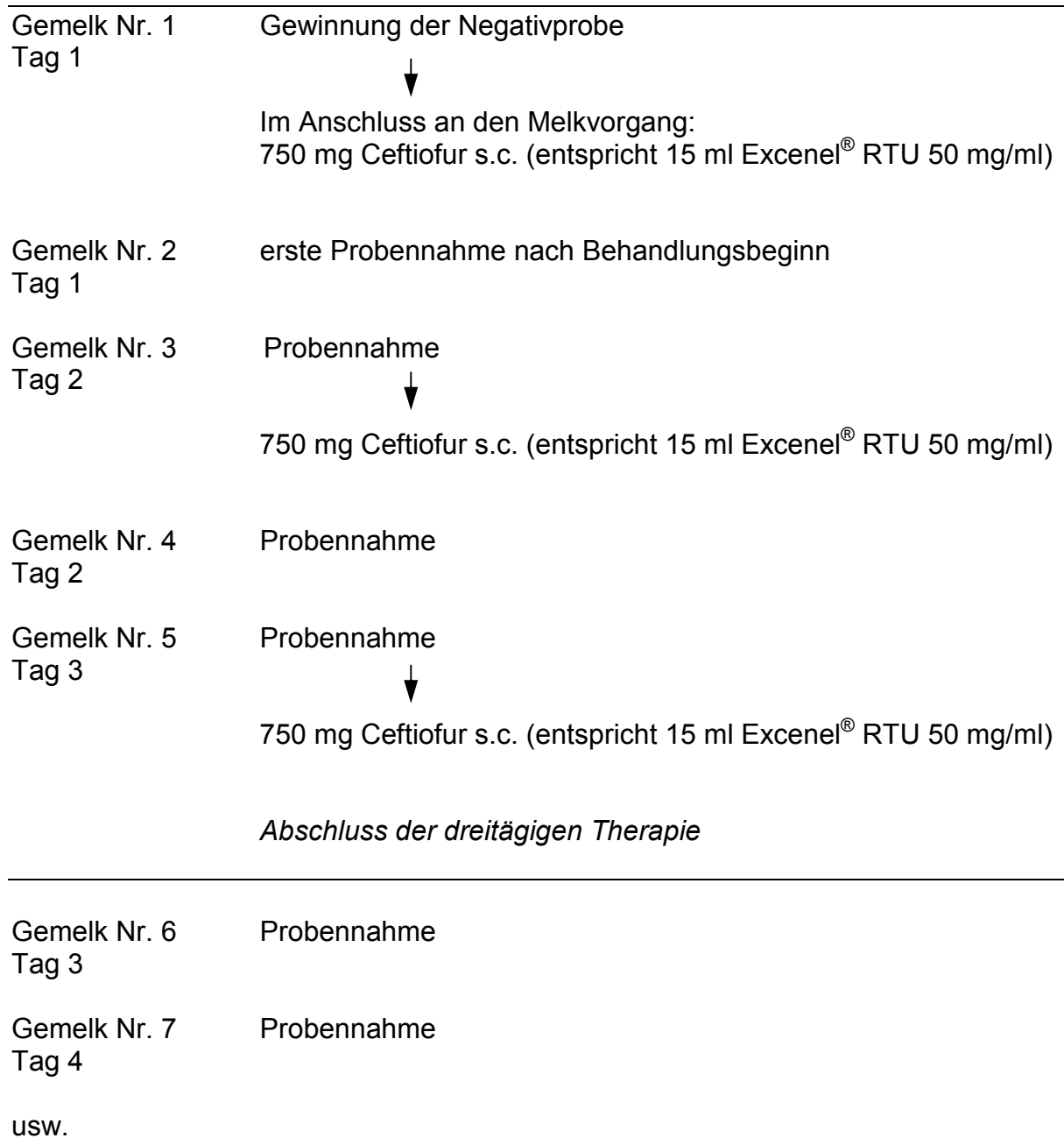


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Behandlungsfrequenz der mit Ceftiofur behandelten Kühe F, G, H, I und J, sowie Zeitpunkte der Probennahme.

3.2.2 Enzymimmunologische Nachweise

3.2.2.1 Enzymimmunologischer Nachweis von Cefquinom

Die Durchführung des kompetitiven indirekten Enzymimmuntest für Cefquinom erfolgte wie von THAL (2006) beschrieben.

Mikrotiterplatten wurden mit dem Cefquinom-Protein-Konjugat (Cefquinom CD-GOx) in der Verdünnung von 1:3000 (in PBS) beschichtet (100 µl pro Kavität). Die Platten wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gelagert. Zum Absättigen noch freier Proteinbindungsstellen wurden nach dem Ausschlagen der Mikrotiterplatten die Kavitäten mit je 200 µl 2% iger Casein-PBS-Lösung befüllt. Nach 30-minütiger Reaktionszeit wurden die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und durch Ausklopfen getrocknet. Im nächsten Schritt wurden Cefquinom-Standardlösungen zur Erstellung der Standardkurve (0,064 ng/ml-200 ng/ml) in 10% Magermilchpulver/PBS sowie ein Cefquinom-freier Ansatz („Blank“/Leerwert) angesetzt. Die entfetteten Milchproben wurden jeweils unverdünnt und in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 (mit 10% Magermilchpulver/PBS) angesetzt.

Zusätzlich wurde entfettete Vollmilch aus dem Handel mit Cefquinom versetzt (10-40 ng/ml) und als Vergleichsprobe in jedem Testdurchlauf mitgeführt.

Jeweils 50 µl der Cefquinom-Standardlösung bzw. der Probenlösung wurden in Zweifachansätzen in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurde ungefälltes Anti-Cefquinom-Antiserum von Kaninchen 17, Pool 20-68 (THAL 2006) in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS zu je 50 µl pro Kavität hinzugegeben und für eine Stunde im Mikrotiterplattentaumelgerät inkubiert. Vor der Zugabe des Sekundärantikörpers Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP in Verdünnung von 1:1000 in 1% Casein/PBS-Lösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten mit Waschlösung dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde und einem Waschschrift wurde Enzymsubstrat/ Chromogen-Lösung (100 µl Substrat pro Kavität) zugegeben. Nach circa 10-20 Minuten wurde die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktion bei 450 nm wurde gemessen (ELISA-Reader) und die Tests mittels RIDAWIN-Software ausgewertet. Die Extinktionswerte des Cefquinom-freien Ansatzes („Blank“) wurden hierbei gleich 100% gesetzt. Die für die jeweiligen Cefquinom-Konzentrationen ermittelten Extinktionswerte wurden als Prozentwerte der Extinktion des „Blank“-Wertes ausgedrückt. Anhand der Werte der Standardreihe erstellte das Programm eine Standardkurve zur Quantifizierung der Cefquinom-Gehalte unbekannter Proben. Zur Auswertung der Probenmesswerte wurden nur Werte berücksichtigt, die ihren Extinktionswert im linearen Bereich der Kurve hatten (ca. 20%-80% B/B0).

3.2.2.2 Enzymimmunologischer Nachweis von Desfuoylceftiofur

Der enzymimmunologische Nachweis für Ceftiofur bzw. Desfuoylceftiofur wurde als kompetitiver indirekter EIA wie von MEIER (2008) beschrieben durchgeführt. Da mit diesem Test bei den durchgeführten parenteralen Applikationen des Wirkstoffs Ceftiofur lediglich Desfuoylceftiofur als Rückstandsbildner zu erwarten ist, wurde zur Quantifizierung im EIA eine Desfuoylceftiofur-Standardkurve verwendet.

Zur Testdurchführung wurde Ceftiofur-BSA-Konjugat in einer Konzentration von 1:3000 (Bicarbonatpuffer) verdünnt und zur Beschichtung von Mikrotiterplatten (100 µl/Kavität) verwendet. Nach dem Ausschlagen der Platten wurden freie Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 2% Casein-PBS-Lösung (200 µl/Kavität) abgesättigt. Die Platten wurden dreimal mit Waschlösung gewaschen und durch Ausklopfen getrocknet. Im nächsten Schritt wurde zunächst eine Standardreihe aus Desfuoylceftiofur-Stammlösung in Verdünnung mit 10% Magermilchpulver/Aqua dest. und ein antibiotikafreier Leerwert („Blank“) angesetzt. Die Milchproben wurden unverdünnt und in den Verdünnungsstufen 1:3 und 1:9 mit 10% Magermilchpulver/Aqua dest. vorbereitet.

Zusätzlich wurden in jedem Testdurchgang Kontrollproben untersucht. Hierbei handelte es sich um handelsübliche homogenisierte und pasteurisierte Vollmilch die nach dem Entfetten mit Desfuoylceftiofur in Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 200 ng/ml versetzt wurde.

Jeweils 50 µl der Standardlösung bzw. der Probenlösung wurden in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatten in Zweifachansätzen pipettiert. Anschließend wurde

Antiserum des Kaninchen 06, Woche 17½ (MEIER 2008) in einer Verdünnung von 1:1000 mit 1% Casein-PBS-Lösung zu je 50 µl pro Kavität hinzugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen und Ausklopfen der Platten wurde je 100 µl des enzymmarkierten Sekundärantikörper Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP in Verdünnung von 1:1000 mit 1% Casein-PBS-Lösung in die Kavitäten der Mikrotiterplatten pipettiert. Die weitere Testdurchführung erfolgte wie für Cefquinom beschrieben (3.2.2.1).

3.2.3 Durchführung des Rezeptortests (beta-s.t.a.r.)

Zum Vergleich der Ergebnisse des Enzymimmuntests wurden Milchproben von vier Kühen, denen Cefquinom-Präparate appliziert worden waren (Kuh A, Kuh B sowie Kuh A_{TS} und Kuh B_{TS}), mit dem beta-s.t.a.r.-Testsystem untersucht.

Es handelt sich um einen Rezeptorbindungstest, dessen Testprinzip in Kapitel 2.4.2 beschrieben ist. Die Nachweisgrenze des beta-s.t.a.r. für Cefquinom liegt bei 10-15 µg/kg (siehe Tabelle 2.4), was durch künstlich mit Cefquinom versetzte Milchproben (5 ng, 10 ng, 15 ng, 20 ng, 40 ng Cefquinom) in den eigenen Untersuchungen bestätigt wurde.

Zur Durchführung des beta-s.t.a.r.s wurden 100 µl der Milchprobe nach Herstellerangaben zu einer Reagenzlösung (Rezeptor) in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, gemischt und drei Minuten bei 47,5±0,5 °C vorinkubiert. Anschließend wurde ein Teststreifen in das Eppendorf-Gefäß gegeben und weitere zwei Minuten bei 47,5±0,5 °C inkubiert. Die visuelle Testauswertung erfolgte anhand der rosa gefärbten Bande im Bereich des Testfeldes in Relation zur Ausprägung der Referenzbande. Die Färbungsintensität und die Bandenbreite sind umgekehrt proportional zu der in der Probe enthaltenen Cefquinom-Konzentration, d. h. Cefquinom-haltige Proben führen zu einer nur schwach ausgeprägten Bande, stark positive Proben resultieren in einer vollständigen Unterdrückung der Farbentwicklung.

3.2.4 Durchführung des Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT)

Da die auf dem Markt befindlichen mikrobiologischen Testsysteme keine ausreichende Nachweisempfindlichkeit für Cefquinom aufweisen (Tabelle 2.4) und auch für Ceftiofur die Nachweisgrenze im Bereich des MRL liegt, war ein Einsatz dieser Systeme nicht sinnvoll.

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stand jedoch ein BRT-Testsystem mit verbesserter Rezeptur zur Verfügung, mit der eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung möglich war. Dieser als Hemmstofftest BRT-P ESL bezeichnete Test wurde von der Firma AiM (Analytik in Milch GmbH, München) hergestellt.

Alle Proben der zwölf Versuchstiere wurden vergleichend zu den Enzymimmuntests mit dem BRT-Hemmstofftest-P ESL der Firma AiM in Milch untersucht. Das Testprinzip (Kapitel 2.4.1) und die Durchführung entsprechen denen des „herkömmlichen“ Brillantschwarz-Reduktionstests.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatten enthalten ein Gemisch aus Nährstoffen, Testkeimen (*Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis*) und dem Indikator Brillantschwarz, der dem Medium seine blauschwarze Färbung gibt. In die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl Probenmilch in unverdünnter Form und in den Verdünnungsstufen entsprechend der jeweiligen EIAs im Zweifachansatz pipettiert. Auf jeder Platte wurde zusätzlich eine Negativ-Kontrolle (Hemmstoff-freie Milch aus dem Handel), Vergleichsproben (künstliche, mit einer definierten Menge des zu untersuchenden Antibiotikas kontaminierte Milch) und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um einen vom Hersteller mitgelieferten Penicillin G-Standard. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte in einem Wasserbad bei 65 °C cirka drei bis dreieinhalb Stunden in mit Folie verschlossenen Zustand inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Folie entfernt, die restliche Milch durch Waschen mit Leitungswasser abgespült und die Farbstoffreaktion visuell und photometrisch ausgewertet.

Negative Milchproben resultierten in einer Reduktion des Indikators Brillantschwarz von seiner blauschwarzen Farbe in die gelbe Farbe der Reduktionsstufe. Waren in der Milchprobe Cefquinom oder Ceftiofur und Metaboliten enthalten, so wurde das Wachstum des Testkeims gehemmt, der Agar blieb blau. Der Vergleich der Farbreaktionen erfolgte in Relation zur

mitgeführten Positivkontrolle. Alle Kavitäten die mindestens die Farbintensität der Positivkontrolle aufwiesen, wurden als positiv bewertet. Diejenigen, die eine zur Negativkontrolle unterscheidbare Farbintensität aufwiesen, wurden in verschiedenen Abstufungen bewertet (negativ „-“, fraglich „±“, positiv „+“, stark positiv „++“). Hierbei wurde eine völlige Entfärbung des Agars als negativ „-“ gewertet. Proben, die weder als eindeutig positiv noch als eindeutig negativ eingestuft werden konnten (schwachblaue oder verschwommene Färbung des Agars), wurden mit „±“ gewertet. Eine deutliche Gelbfärbung mit schwachblauem Anteil wurde als „+“ gewertet. Wies der Agar dieselbe Blaufärbung wie die Penicillin G-Positivkontrolle auf, so wurde das Ergebnis als „++“ gewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Überprüfung der Testsysteme zum Nachweis von Cefquinom

Nach dem unter 3.2.2.1 beschriebenen Testverfahren wurden in jedem durchgeführten EIA Standardkurven für Cefquinom im Konzentrationsbereich von 0,064 ng/ml bis 200 ng/ml erstellt. Die beim Erreichen der halbmaximalen Bindung (50%-Dosis) erforderliche Cefquinomkonzentration lag zwischen 4,4 ng/ml und 13,2 ng/ml. Nach Auswertung von 27 Tests aus einem Zeitraum von 7 Monaten lag die 50%-Dosis bei $7,8 \pm 4,0$ ng/ml. Der quasilineare Bereich der Standardkurve, der zur Quantifizierung herangezogen wurde, lag typischerweise zwischen 1,5 ng/ml und 30 ng/ml.

Da die Milchproben unverdünnt in das Testsystem eingesetzt werden konnten, wurde ein Wert von 1,5 ng/ml, entsprechend circa 80% B/B₀, als Nachweisgrenze für Cefquinom in Milch festgelegt.

Die Prüfung des BRT-P ESL erfolgte anhand künstlich kontaminierter Milchproben in einem Konzentrationsbereich von 10-40 ng/ml. Bei einer Konzentration von 40 ng/ml wurde ein stets stark positives („++“) Ergebnis erzielt, vergleichbar mit der Farbintensität der mitgeführten Positivkontrolle (Penicillin G-Standard). Konzentrationen von 20 ng/ml wurden in 60% als positiv („+“) ermittelt (3 von 5 Tests). Cefquinom-Konzentrationen von 10 ng/ml ergeben ausnahmslos negative Ergebnisse.

Die Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit des beta-s.t.a.r. Testsystems wurde anhand von künstlich mit Cefquinom in einem Konzentrationsbereich von 2,5-20 ng/ml durchgeführt. Während eine Konzentration von 20 ng/ml stets zu positiven Ergebnissen führte, ergaben Proben mit Cefquinomgehalten von 10 ng/ml bereits teilweise fragliche, nicht eindeutig auswertbare Banden. Konzentrationen von 2,5 ng/ml bzw. 5 ng/ml ergaben stets negative Ergebnisse.

4.2 Überprüfung der Testsysteme zum Nachweis von Desfuroylceftiofur

Für den unter 3.2.2.2 beschriebenen enzymimmunologischen Nachweis von Desfuroylceftiofur wurden Standardkurven in einem Konzentrationsbereich von 8,23 ng/ml bis 2000 ng/ml erstellt. Die beim Erreichen der halbmaximalen Bindung (50%-Dosis) erforderliche DFC-Konzentration lag zwischen 81,8 ng/ml und 124,9 ng/ml. Nach der Auswertung von 8 Tests aus einem Zeitraum von 5 Monaten lag die 50%-Dosis bei 97 ± 16 ng/ml. Der quasilineare Bereich der Standardkurve, der zur Quantifizierung herangezogen wurde, lag bei ca. 25 ng/ml. Als Nachweisgrenze für DFC in Milch wurde, entsprechend der 80% Dosis B/B0 (Ende des quasilinearen Bereichs der Standardkurve), somit ein Wert von 25 ng/ml festgelegt.

Zur Überprüfung des BRT-P ESL wurden künstlich kontaminierte Milchproben in einem Konzentrationsbereich von 20-200 ng/ml eingesetzt. Bei einer Konzentration ab 150 ng/ml wurde ein stets stark positives („++“) Ergebnis erzielt, vergleichbar mit der Farbintensität der mitgeführten Positivkontrolle (Penicillin G-Standard). Konzentrationen von 80 ng/ml wurden in 60% als positiv („+“) ermittelt (3 von 5 Tests). DFC-Konzentrationen von 40 ng, 20 ng und 10 ng ergeben ausnahmslos negative Ergebnisse.

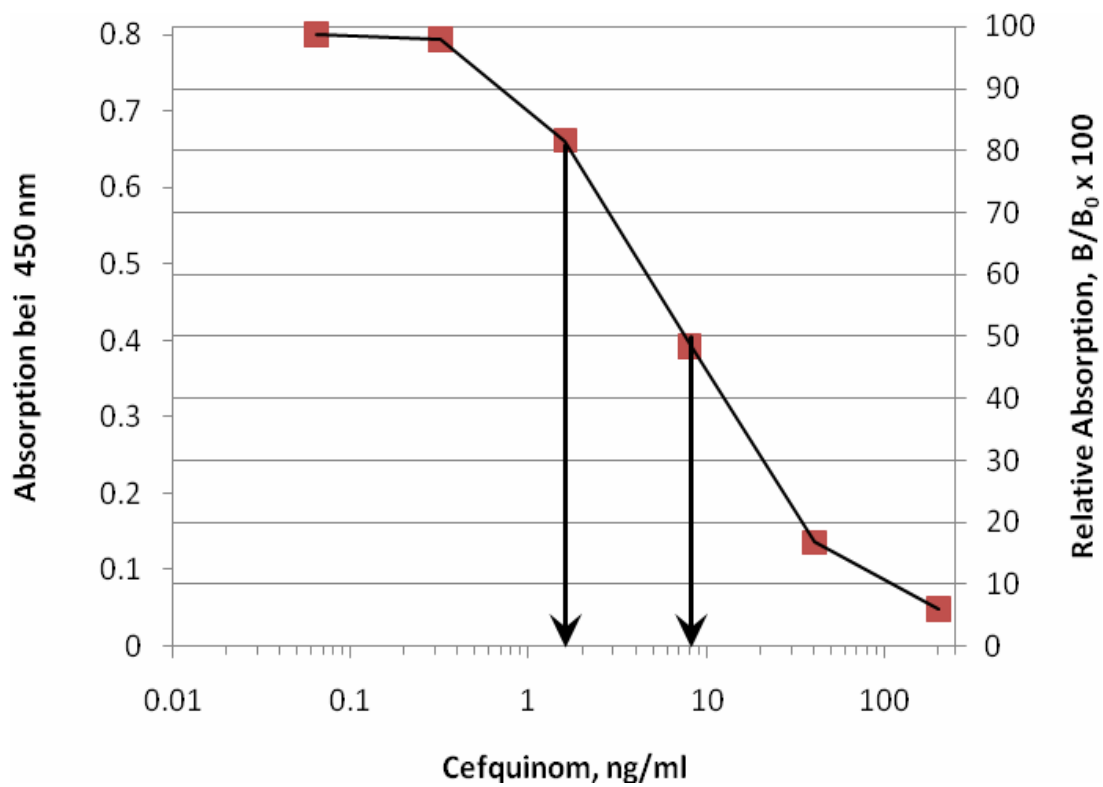


Abbildung 4.1: Charakteristische Standardkurve des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests zum Nachweis von Cefquinom in Milch. Die mittlere 50%-Dosis der Standardkurve lag bei $7,8 \pm 4,0$ ng/ml ($n=27$), die mittlere Nachweisgrenze (Ende des quasilinearen Bereichs, typischerweise entsprechend der 80%-Dosis) bei ca. 1,5 ng/ml.

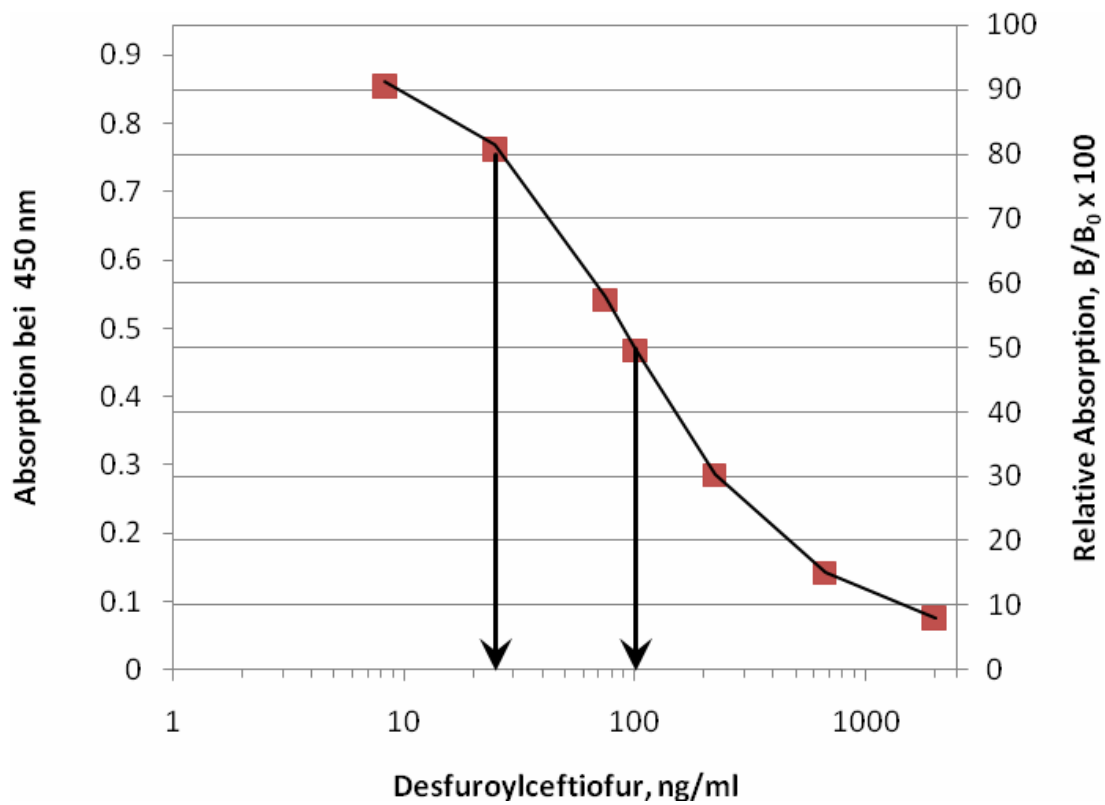


Abbildung 4.2: Charakteristische Standardkurve des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests zum Nachweis von Desfuoylceftiofur in Milch. Die mittlere 50%-Dosis der Standardkurve lag bei 97 ± 16 ng/ml ($n=8$), die mittlere Nachweisgrenze (Ende des quasilinearen Bereichs, typischerweise entsprechend der 80%-Dosis) bei ca. 25 ng/ml.

4.3 Nachweis von Cefquinom in Milch nach gleichzeitiger intramuskulärer und intramammärer Applikation

Eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Enzymimmuntests, des BRTs und des β -s.t.a.r. der gleichzeitig intramuskulär und intramammär mit Cefquinom behandelten Tiere A, B, C, und D sind in den Tabellen 4.1 (Kuh A), 4.2 (Kuh B), 4.3 (Kuh C) und 4.4 (Kuh D) zusammengefasst.

In der Abbildung 4.3 sind die für Cefquinom ermittelten Konzentrationen der jeweiligen Gemelke nach Behandlungsbeginn graphisch dargestellt. Die Ergebnisse beziehen sich hierbei jeweils nur auf das intramammär behandelte Euterviertel.

In Tabelle 4.5 sind die für ein Tier (Kuh E) exemplarisch durchgeführten vergleichenden Untersuchungen aller vier Euterviertel zusammengestellt. Es zeigte sich hierbei, dass der Beitrag der intramuskulären Applikation zur Gesamtausscheidung nur gering war. Die Höchstgehalte an Rückständen nach intramuskulärer Applikation lagen bei ca. 20 ng/ml für nicht intramammär behandelte Euterviertel und Proben, die innerhalb der Wartezeit gezogen worden waren. In der Sammelmilchprobe dieses Tieres entsprachen die Cefquinomgehalte den durch die Verdünnung der Milch des intramammär behandelten Viertels durch die Milch der drei übrigen Viertel.

Ab dem dritten Tag, bei Kuh B ab dem vierten Tag, nach Behandlungsende wurden bei allen untersuchten Tieren weder im β -s.t.a.r., im BRT-P und noch im EIA Cefquinom-Konzentrationen oberhalb des MRL von 20 ng/ml gefunden. Cefquinom-Rückstände oberhalb des MRL wurden nach Ablauf der Wartezeit nicht festgestellt.

Maximale Konzentrationen wurden im Behandlungszeitraum (Gemelke Nr. 2 bis Nr. 7) gemessen, wobei nach der zweiten und dritten systemischen Applikation Höchstwerte von über 27.000 ng/ml erreicht wurden. Nach Behandlungsende sank die Cefquinom-Konzentration in den untersuchten Viertelgemelkproben rasch auf Werte unterhalb des MRL, nach dem neunten Gemelk (zweiter Tag nach Behandlungsende) wurden Maximalwerte von knapp 60 ng/ml erreicht, bei Kuh E wurde der MRL-Wert von 20 ng/ml sogar unterschritten.

Vergleicht man die Ergebnisse der angewendeten Hemmstofftests, so zeigten die Messergebnisse des Cefquinom-EIAs mit denen des BRT-Ps und des β eta-s.t.a.r.s in höheren Konzentrationsbereichen eine gute Übereinstimmung.

In niedrigeren Konzentrationsbereichen, zwischen 15 und 40 ng/ml, wurden zum Teil deutliche Abweichungen der Ergebnisse festgestellt. Besonders im Bereich der Gemelke Nr. 9 bis 11 (zweiter und dritter Tag nach Behandlungsende) erbrachte lediglich der Enzymimmuntest noch positive Ergebnisse, bedingt durch die bessere Nachweisempfindlichkeit.

Eine vergleichende Untersuchung zwischen β eta-s.t.a.r und BRT-P wurde für die Viertelgemelksproben von zwei Tieren (Kuh A, Kuh B) durchgeführt. Unter Berücksichtigung der etwas differenzierenden Testsensitivität zeigte sich hierbei eine gute Übereinstimmung.

Tabelle 4.1: Untersuchungsergebnisse in Viertelgemelksproben von Kuh A. Das Tier wurde therapeutisch mit 625 mg Cefquinom i.m., einmal täglich über drei Tage sowie mit je 75 mg Cefquinom intramammär, zweimal täglich über drei Tage, behandelt. Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle vor Behandlungsbeginn.

Gemelk Nr.*	Ergebnis Cefquinom in intramammär behandeltem Viertel		
	βeta-s.t.a.r	BRT-P	EIA (ng/ml)
1	-	-	<1,5
2	++	++	<1,5
3	++	++	13.700
4	++	++	3.170
5	++	++	3.290
6**	++	++	5.290
7	++	++	5.620
8	++	++	314
9	++	++	73,8
10	+	-	23,8
11	±	-	11,8
12	-	-	7,2
13	-	-	<1,5
14	-	-	<1,5
15	-	-	<1,5
16***	-	-	<1,5
17	-	-	<1,5
18	-	-	<1,5
19	-	-	<1,5

* zwei Gemelke je Tag

** letzte intramammäre Dosis

*** letztes Gemelk innerhalb der fünftägigen Wartezeit

Tabelle 4.2: Untersuchungsergebnisse in Viertelgemelksproben von Kuh B. Das Tier wurde therapeutisch mit 625 mg Cefquinom i.m., einmal täglich über drei Tage sowie mit je 75 mg Cefquinom intramammär, zweimal täglich über drei Tage, behandelt. Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle vor Behandlungsbeginn.

Gemelk Nr.*	Ergebnis Cefquinom in intramammär behandeltem Viertel		
	βeta-s.t.a.r	BRT-P	EIA (ng/ml)
1	-	±	13,7
2	++	++	10.800
3	+	++	21.300
4	++	++	2.500
5	+	++	27.300
6**	++	++	8.930
7	+	++	8.310
8	±	++	518
9	-	+	317
10	-	-	37,5
11	-	-	31
12	-	-	15,4
13	-	-	9,63
14	-	-	4,92
15	-	-	<1,5
16***	-	-	10,6
17	-	±	14,6
18	-	-	<1,5
19	-	-	<1,5

* zwei Gemelke je Tag

** letzte intramammäre Dosis

*** letztes Gemelk innerhalb der fünftägigen Wartezeit

Tabelle 4.3: Untersuchungsergebnisse in Viertelgemelksproben von Kuh C. Das Tier wurde therapeutisch mit 625 mg Cefquinom i.m., einmal täglich über drei Tage sowie mit je 75 mg Cefquinom intramammär, zweimal täglich über drei Tage, behandelt. Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle vor Behandlungsbeginn.

Gemelk Nr.*	Ergebnis Cefquinom in intramammär behandeltem Viertel	
	BRT-P	EIA (ng/ml)
1	-	<1,5
2	++	1.880
3	++	3.550
4	++	3.530
5	++	4.640
6**	++	7.770
7	++	6.780
8	++	2.910
9	++	1.140
10	+	57,3
11	-	1,81
12	-	12,8
13	-	1,75
14	-	<1,5
15	-	2,38
16***	-	<1,5
17	-	<1,5
18	-	<1,5
19	-	<1,5

* zwei Gemelke je Tag

** letzte intramammäre Dosis

*** letztes Gemelk innerhalb der fünftägigen Wartezeit

Tabelle 4.4: Untersuchungsergebnisse in Viertelgemelksproben von Kuh D. Das Tier wurde therapeutisch mit 625 mg Cefquinom i.m., einmal täglich über drei Tage sowie mit je 75 mg Cefquinom intramammär, zweimal täglich über drei Tage, behandelt. Gemelk 1 entspricht der Negativkontrolle vor Behandlungsbeginn.

Gemelk Nr.*	Ergebnis Cefquinom in intramammär behandeltem Viertel	
	BRT-P	EIA (ng/ml)
1	-	<1,5
2	++	20.300
3	++	2.000
4	+	3.040
5	++	5.150
6**	++	22.800
7	++	11.000
8	++	1.380
9	+	62,3
10	+	22,5
11	-	2,64
12	-	1,64
13	-	<1,5
14	-	<1,5
15	-	<1,5
16***	-	<1,5
17	-	<1,5
18	-	<1,5
19	-	<1,5

* zwei Gemelke je Tag

** letzte intramammäre Dosis

*** letztes Gemelk innerhalb der fünftägigen Wartezeit

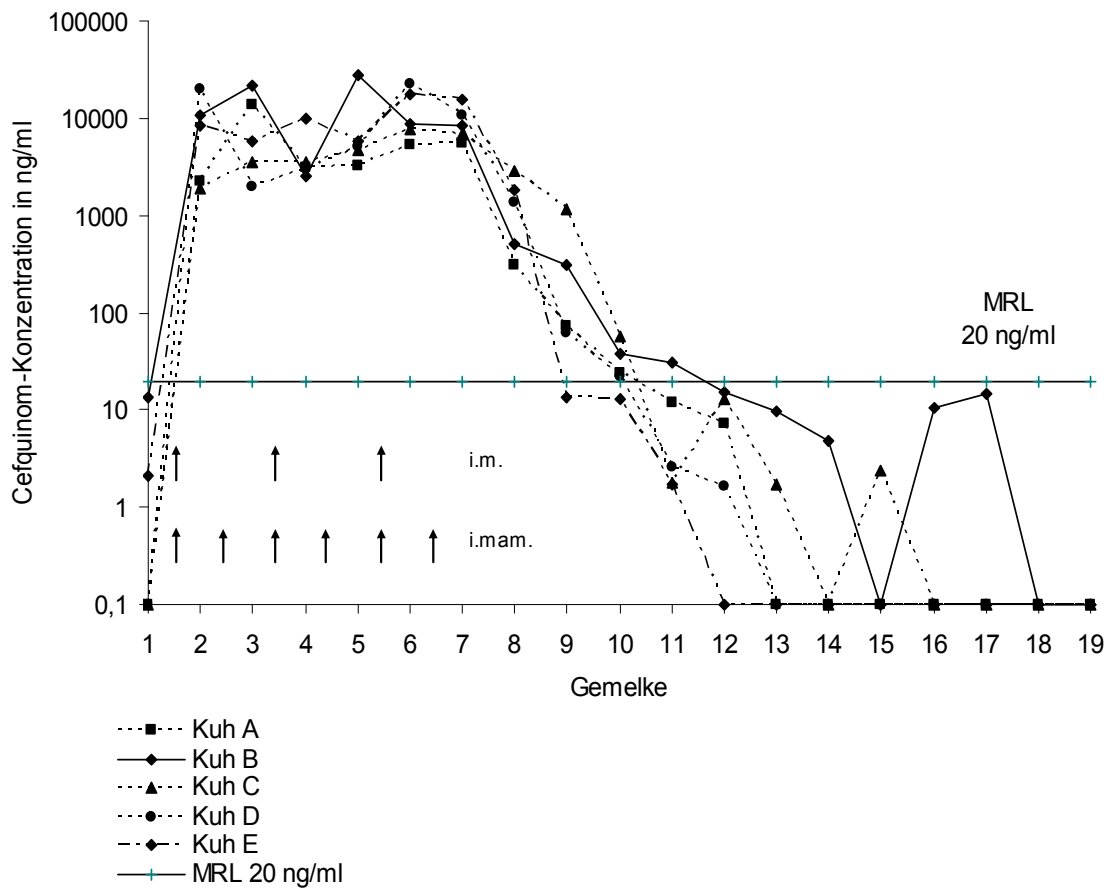


Abbildung 4.3: Vergleich des Ausscheidungsverlaufs von Cefquinom in Viertelgemelksproben von 5 Kühen (Kuh A, B, C, D und E) nach therapeutischer Applikation von 625 mg Cefquinom i.m. einmal täglich über drei Tage und intramammärer Behandlung mit je 75 mg Cefquinom pro Melkzeit (zweimal täglich) über drei Tage (↑). Untersucht wurde jeweils die Milch des i.mam. behandelten Euterviertels. Das letzte Gemelk innerhalb der 5-tägigen Wartezeit ist Gemelk Nr. 16.

Tabelle 4.5: Cefquinom-Rückstandsgehalte in Sammelmilchproben und Viertelgemelksproben eines Tieres (Kuh E) nach kombinierter i.m. Behandlung und zusätzlicher i.mam. Behandlung des linken hinteren Euterviertels.

Cefquinom EIA Ergebnis (ng/ml) und visuelles Ergebnis des BRT-P in Milchprobe aus											
Gemelk Nr.	Sammelmilchprobe		Viertel links hinten (i.mam.)		Viertel rechts hinten		Viertel links vorne		Viertel rechts vorne		
	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	
i.m., i.mam											
1	335	++	8.550	++	17,6	+	10,7	++	7,1	+	
i.mam.											
2	550	++	5.820	++	<1,5	-	4,7	+	<1,5	+	
i.m., i.mam											
3	200	++	9.900	++	<1,5	+	6,2	+	7,9	+	
i.mam.											
4	1.130	++	5.760	++	<1,5	-	<1,5	+	<1,5	+	
i.m., i.mam.											
5	1.620	++	17.910	++	12,2	±	<1,5	+	18,2	++	
i.mam.											
6	1.380	++	15.900	++	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	
7	183	++	1.810	++	<1,5	-	<1,5	+	<1,5	-	
8	8,4	±	13,3	++	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	
9	<1,5	-	13,2	-	<1,5	-	<1,5	+	<1,5	-	
10	<1,5	-	1,8	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	
11-18	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	

4.4 Nachweis von Cefquinom in Milch nach dem Trockenstellen

Zwei Tiere („A_{TS}“ und „B_{TS}“) wurden jeweils durch intramammäre Gabe von 150 mg Cefquinom pro Euterviertel „trocken gestellt“. Die Wartezeit des Trockenstellers Cobactan[®] DC beträgt bei beiden Tieren einen Tag nach dem Abkalben. Bei beiden Tieren war die Trockenstehperiode länger als 36 Tage.

Die Sammelgemelksproben der beiden Tiere wurden in der folgenden Laktationsperiode sowohl mit dem β -s.t.a.r, dem BRT-P und mit dem Cefquinom-EIA untersucht. Die einzelnen Viertelgemelksproben wurden nur mit dem β -s.t.a.r und dem Enzymimmuntest bearbeitet.

Eine Übersicht über die in dieser Untersuchungsreihe erhaltenen Ergebnisse liefern Tabellen 4.6 und 4.7 und die Abbildung 4.4 und 4.5.

Die Sammelgemelksproben wiesen bei beiden Tieren nur geringe Rückstandskonzentrationen auf, der Maximalwert lag bei 14,5 ng/ml.

Der mikrobiologische Hemmstofftest (BRT-P) und auch der Rezeptorbindungstest (β -s.t.a.r) lieferten in diesem niedrigen Konzentrationsbereich keine zuverlässigen Ergebnisse.

In den Proben von Kuh A_{TS} wurden mittels β -s.t.a.r. und BRT-P im ersten Gemelk nach Kalbung deutlich positive Ergebnisse erhalten, was nur bei sehr hohen Cefquinom-Konzentrationen zu erwarten gewesen wäre. Der BRT-P ergab hier zudem oft fragliche Ergebnisse, während mittels Enzymimmuntest in derselben Probe nur geringe bzw. keine Cefquinom-Rückstände nachgewiesen wurden.

Einen erheblichen Anteil an diesen einander widersprechenden Ergebnissen dürfte die von reifer Milch abweichende Zusammensetzung der Kolostralmilch haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Viertelgemelksproben über einen Zeitraum von vier Tagen untersucht. Bei Kuh A_{TS} wurden in den ersten beiden Gemelken nach der Kalbung in Milchproben von drei Eutervierteln mittels Cefquinom-EIA Konzentrationen knapp oberhalb

des MRL-Wertes (maximal 23,90 ng/ml) nachgewiesen. Maximale Konzentrationen von 19,70 ng/ml wurden bei Kuh B_{TS} gemessen. Bei den Einzelproben der jeweiligen Viertel zeigte sich zwischen Enzymimmuntest und β eta-s.t.a.r eine gute Übereinstimmung der Resultate.

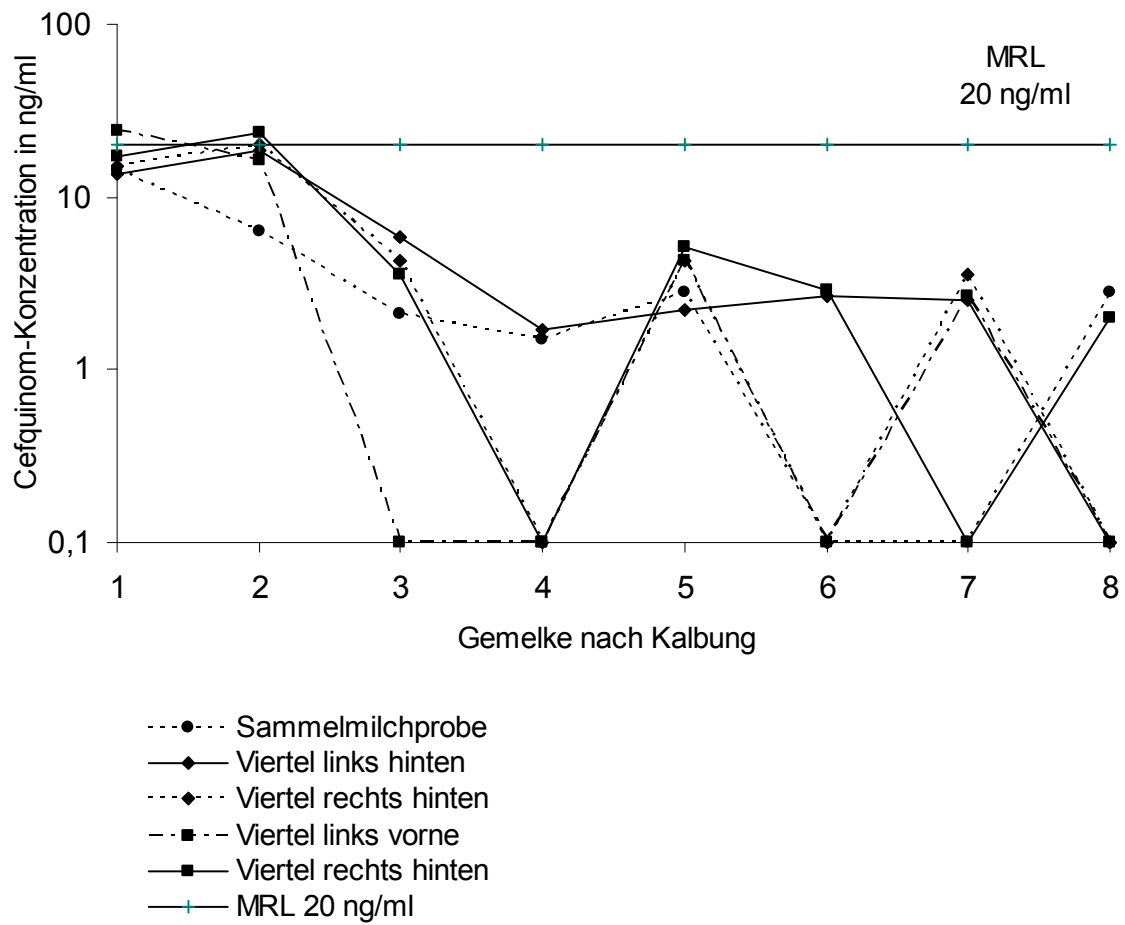


Abbildung 4.4: Vergleich des Ausscheidungsverlaufs von Cefquinom in Sammelmilchproben und Viertelgemelksproben von Kuh A_{TS}. Je Euterviertel waren 150 mg Cefquinom intramammär appliziert worden. Gemelk Nr. 1 entspricht der ersten Probennahme post partum.

Tabelle 4.6: Cefquinom-Rückstandsgehalte in Sammelmilchproben und Viertelgemelksproben eines Tieres (Kuh A₁₅) im Cefquinom-EIA, BRT-P und beta-s.t.a.r. nach therapeutischer Applikation von je 150 mg Cefquinom pro trocken gestelltes Euterviertel. Gemelk Nr. 1 entspricht der ersten Probennahme post partum.

Cefquinom EIA Ergebnis (ng/ml) und visuelle Ergebnisse des BRT-P bzw. des beta-s.t.a.r. in Milchprobe aus											
Sammelmilchprobe											
Gemelk Nr.	EIA	BRT-P	beta-s.t.a.r.	EIA	beta-s.t.a.r.	Viertel links hinten	Viertel rechts hinten	Viertel links vorne	Viertel rechts vorne		
						EIA	beta-s.t.a.r.	EIA	beta-s.t.a.r.	EIA	beta-s.t.a.r.
1	14,5	++	++	13,7	-	15,1	-	23,9	+	17,1	-
2	6,4	+	-	18,6	-	20	±	16,4	-	23,6	-
3	2,1	-	-	5,9	-	4,3	-	<1,5	-	3,6	-
4	1,5	-	-	1,7	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-
5	2,8	-	-	2,2	-	4,3	-	4,23	-	5,2	-
6	<1,5	±	-	2,7	-	<1,5	-	<1,5	-	2,9	-
7	<1,5	±	-	2,5	-	3,6	-	2,68	-	<1,5	-
8	2,8	-	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	2,0	-

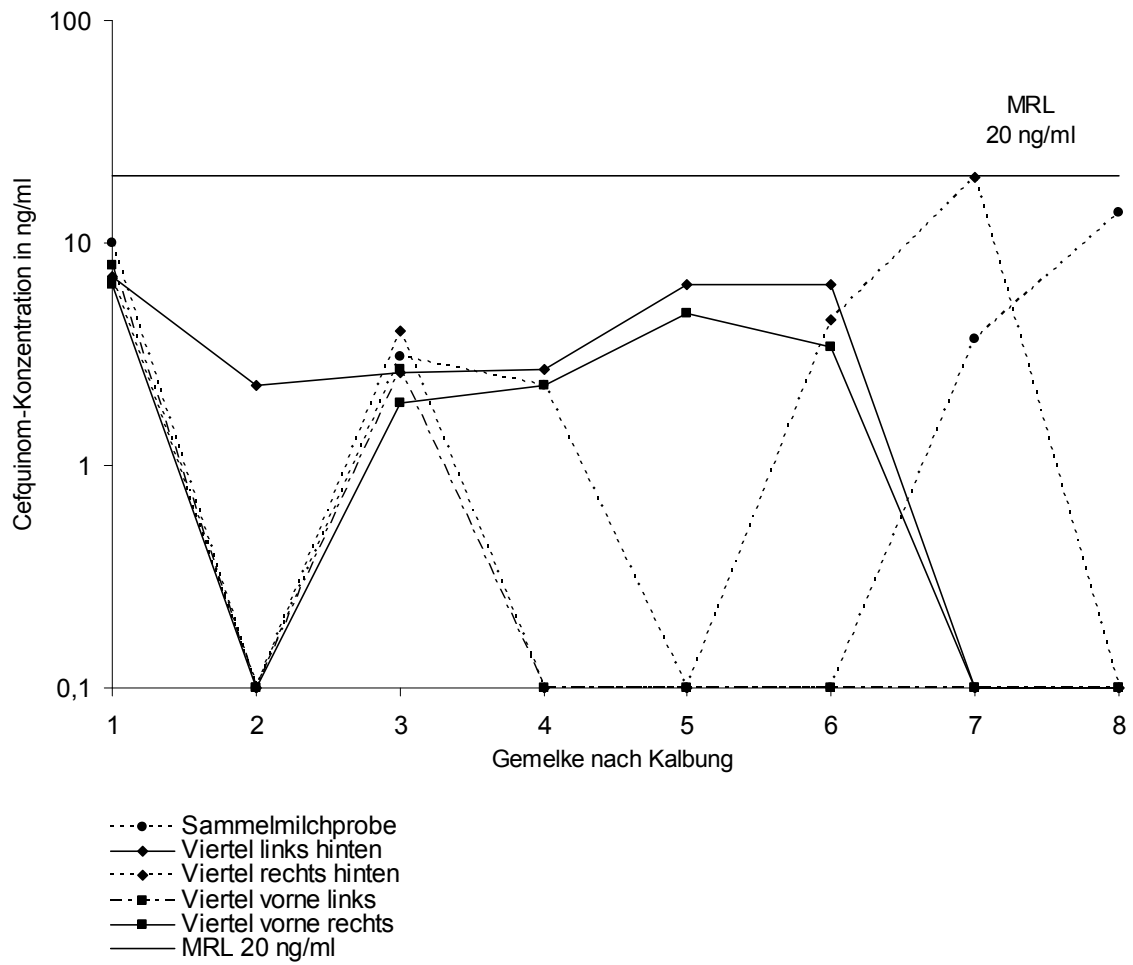


Abbildung 4.5: Vergleich des Ausscheidungsverlaufs von Cefquinom in Sammelmilchproben und Viertelgemelksproben von Kuh B_{TS}. Je Euterviertel waren 150 mg Cefquinom intramammär appliziert worden. Gemelk Nr. 1 entspricht der ersten Probennahme post partum.

Tabelle 4.7: Cefquinom-Rückstandsgehalte in Sammelmilchproben und Viertelgemelksproben eines Tieres (Kuh B₁₅) im Cefquinom-EIA, BRT-P und β -s.t.a.r. nach therapeutischer Applikation von je 150 mg Cefquinom pro trocken gestelltes Euterviertel. Gemelk Nr. 1 entspricht der ersten Probennahme post partum.

Cefquinom EIA Ergebnis (ng/ml) und visuelle Ergebnisse des BRT-P bzw. des β -s.t.a.r. in Milchprobe aus											
Gemelke Nr.	Sammelmilchprobe			Viertel links hinten			Viertel rechts hinten			Viertel rechts vorne	
	EIA	BRT-P	β -s.t.a.r.	EIA	β -s.t.a.r.	EIA	β -s.t.a.r.	EIA	β -s.t.a.r.	EIA	β -s.t.a.r.
1	10,0	+	±	7,1	-	6,9	-	7,9	-	6	-
2	<1,5	±	-	2,3	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-
3	3,1	±	-	2,6	-	4,0	-	2,7	-	1	-
4	2,3	-	-	2,7	-	<1,5	-	<1,5	-	2,3	-
5	<1,5	-	-	6,5	-	<1,5	-	<1,5	-	4	-
6	<1,5	-	-	6,5	-	4,5	-	<1,5	-	3	-
7	3,7	-	-	<1,5	-	19,7	-	<1,5	-	<1,5	-
8	13,6	-	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-	<1,5	-

4.5 Nachweis von Desfuoylceftiofur in Milch nach systemischer Applikation

Die Ergebnisse der mit Ceftiofur behandelten Kühe F, G, H, I und J sind in einer tabellarischen Zusammenstellung der beiden Testverfahren (BRT-P bzw. DFC-Enzymimmuntest) in den Tabellen 4.8 (Kuh F) und 4.9 (Kuh G, Kuh H, Kuh I und Kuh J) aufgeführt. Eine graphische Darstellung der erhaltenen Messwerte im Enzymimmuntest zeigen die Abbildungen 4.6 (Kuh F) und 4.7 (Kuh G, Kuh H, Kuh I und Kuh J).

Alle fünf Tiere dieser Gruppe wurden über drei Tage hinweg einmal täglich mit je 750 mg Ceftiofur subkutan behandelt. Die Wartezeit auf Milch beträgt bei diesem Präparat null Tage.

Betrachtet man die Ergebnisse der Kühe G, H, I und J konnte eine Ausscheidung von DFC zwei bis maximal drei Tage nach Behandlungsende mit dem DFC-EIA nachgewiesen werden.

Die höchsten Rückstandskonzentrationen wurden innerhalb des dreitägigen Behandlungszeitraumes und für ein Gemelk (Gemelk Nr. 6) nach Abschluss der Behandlung gemessen, der Maximalwert lag bei 71,4 ng/ml. Im Anschluss an das fünfte Gemelk erfolgte die letzte subkutane Ceftiofur-Injektion. Im sechsten Gemelk wurden nochmals leicht erhöhte DFC-Konzentrationen gemessen (maximal 60,6 ng/ml), in den drauffolgenden Gemelken sank die Konzentration zügig ab, sodass ab dem neunten Gemelk (Kühe G, H, I; zweiter Tag nach Behandlungsende) bzw. ab dem zwölften Gemelk (Kuh J, dritter Tag nach Behandlungsende) keinerlei Rückstände nachgewiesen wurden.

Der BRT-P ergab bereits für Proben des ersten Tags nach Behandlungsende negative Ergebnisse.

Während des Behandlungszeitraumes und auch danach konnte in keinem der vier Fälle eine Ausscheidung des Ceftiofur-Metaboliten oberhalb der gesetzlichen Rückstandshöchstmenge von 100 ng/ml beobachtet werden.

Die ebenfalls mit Ceftiofur behandelte Kuh F (Indikation Endometritis) verkalbte drei Tage vor Therapiebeginn. Die Trockenstehperiode war mit zehn Tagen (bzw. dreizehn Tagen bis Therapiebeginn) stark verkürzt. Als Präparat zum Trockenstellen war, wie bei den Tieren A_{TS}

und B_{TS}, Cobactan[®] DC (Wirkstoff Cefquinom) verwendet worden. Daher ergab sich für den Trockensteller Cobactan[®] DC eine Wartezeit von 36 Tagen auf Milch (Trockenstehzeit fünf Wochen und weniger). Zum Zeitpunkt der ersten Ceftiofur-Applikation musste also noch eine Wartezeit von 23 Tagen für den Cefquinom-haltigen Trockensteller berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse des BRT-P von Kuh F waren in allen 13 gewonnenen Sammelgemelken deutlich positiv, wobei mit diesem Test keine Wirkstoffdifferenzierung möglich war.

Die Milchproben von Kuh F wurden daher sowohl mit dem Enzymimmuntest für DFC als auch mit dem Enzymimmuntest für Cefquinom untersucht. Der Cefquinom-EIA wurde nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 3.2.2.1 durchgeführt. Künstlich mit Cefquinom angereicherte Vergleichsproben in den Konzentrationen 20 ng und 10 ng wurden ebenfalls mitgeführt.

Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 4.8 und die Abbildung 4.6.

Im Vergleich zu den Testkühen G, H, I, und J wurden im DFC-EIA für Kuh F deutlich höhere Messwerte erhalten. Ein Maximalwert von 238 ng/ml wurde nach der ersten Injektion des Ceftiofur-Präparates (Gemelk Nr. 2) erreicht. Bis zum einschliesslich vierten Gemelk lagen die Konzentrationen oberhalb des MRL von 100 ng/ml. Die übrigen vier Probandinnen zeigten für DFC maximal ein Drittel dieses Ausscheidungsverhaltens und überschritten nicht den rechtlichen Höchstmengegehalt des Ceftiofur-Metaboliten in Milch. Die letzte Ceftiofur-Injektion wurde im Anschluss an die Entnahme des fünften Gemelkes vorgenommen. Betrachtet man allein die Ergebnisse für DFC, so lag die Konzentration am Tag nach der letzten Behandlung unterhalb der zulässigen Höchstmenge von 100 ng/ml und sank in den darauf folgenden Tagen weiter ab. Bis zum dreizehnten Gemelk wurden DFC-Rückstände unterhalb des MRL-Niveaus gemessen.

Mit dem Cefquinom-EIA wurde bereits in der Negativprobe (Gemelk Nr. 1, vor Beginn der Therapie mit Ceftiofur und den zusätzlich angewendeten Arzneimitteln) eine Rückstandsmenge von 739 ng/ml gemessen. Während der folgenden Tage sank die Cefquinom-Konzentration kontinuierlich ab, erreichte aber erst am sechsten Tag (Gemelk Nr. 11) Werte unter der gesetzlich festgelegten Höchstmenge für Cefquinom von 20 ng/ml. Ein

erneuter Anstieg der Konzentration wurde nur eine Melkzeit später festgestellt (28,4 ng/ml). Im zuletzt gewonnenen Gemelk (Gemelk Nr. 13) wurde der MRL knapp unterschritten.

Die Ergebnisse des mikrobiologischen Hemmstofftest zeigten sowohl in den höheren Konzentrationsbereichen als auch in den niedrigeren gute Übereinstimmungen mit den enzymimmunologischen Testverfahren. Selbst Konzentrationen unterhalb des MRL-Wertes lieferten positive Ergebnisse im BRT-P.

Die Probennahme war bei diesem Tier mit Gemelk 13 beendet worden. Zu diesem Zeitpunkt waren noch DFC-Messwerte bzw. Cefquinom-Messwerte deutlich über der Nachweisgrenze feststellbar.

Tabelle 4.8: Rückstandsbefunde für DFC und Cefquinom in Sammelmilch von Kuh F nach systemischer Applikation von 750 mg Ceftiofur s. c. (einmal täglich über drei Tage) sowie von je 150 mg Cefquinom pro trocken gestelltem Euterviertel. Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle für DFC vor Behandlungsbeginn und der ersten Probennahme für Cefquinom nach dem Trockenstellen dreizehn Tage zuvor.

Gemelk Nr.	Ergebnis Testsystem		
	BRT-P	DFC-EIA (ng/ml)	Cefquinom-EIA (ng/ml)
1	++	90,9	739,0
2	++	238,0	286,0
3	++	176,0	290,0
4	++	136,0	156,0
5	++	67,8	118,0
6	++	75,3	71,8
7	++	66,4	63,7
8	++	42,5	57,4
9	++	37,8	31,3
10	+	32,1	20,9
11	+	33,2	14,5
12	++	22,1	28,4
13	+	31,0	17,0

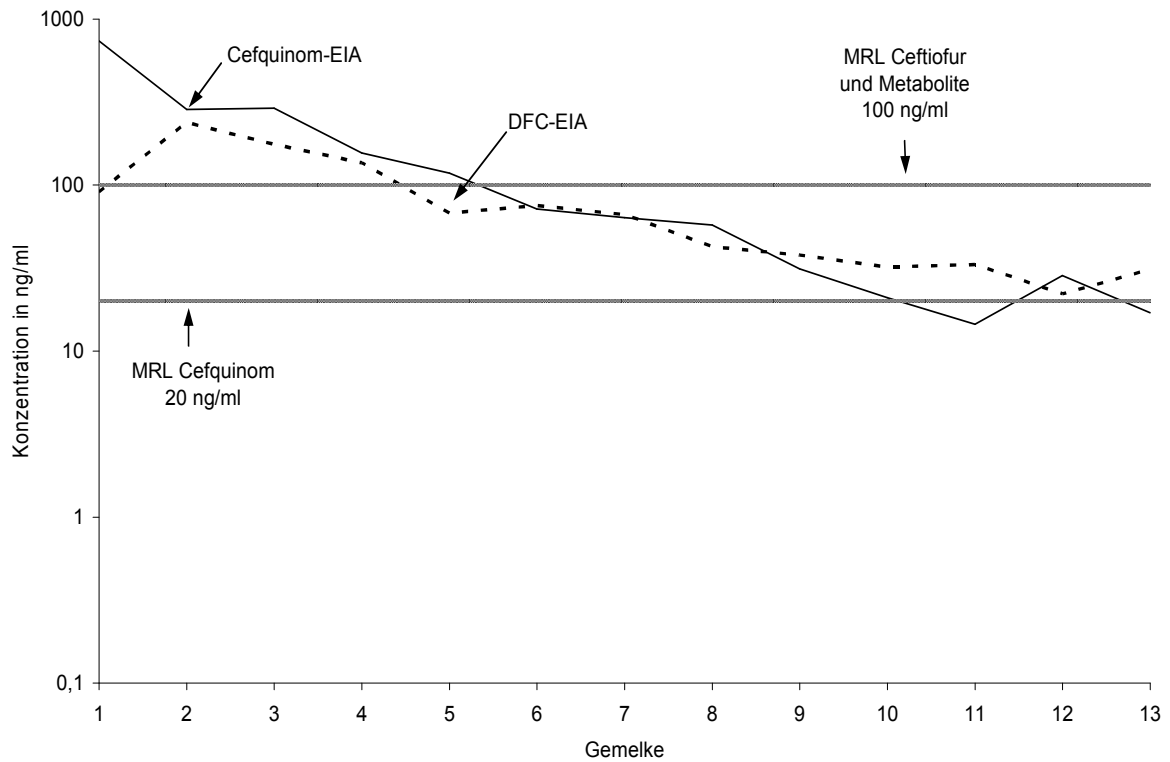


Abbildung 4.6: Messwerte von DFC (gestrichelte Linie) und Cefquinom (durchgezogene Linie) in Milch bei Kuh F nach therapeutischer Applikation von 750 mg Ceftiofur s.c., einmal täglich über drei Tage, sowie der Applikation von je 150 mg Cefquinom pro trocken gestelltes Euterviertel. Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle für DFC vor Behandlungsbeginn, gleichzeitig aber auch der ersten Probennahme für Cefquinom nach dem Trockenstellen dreizehn Tage zuvor.

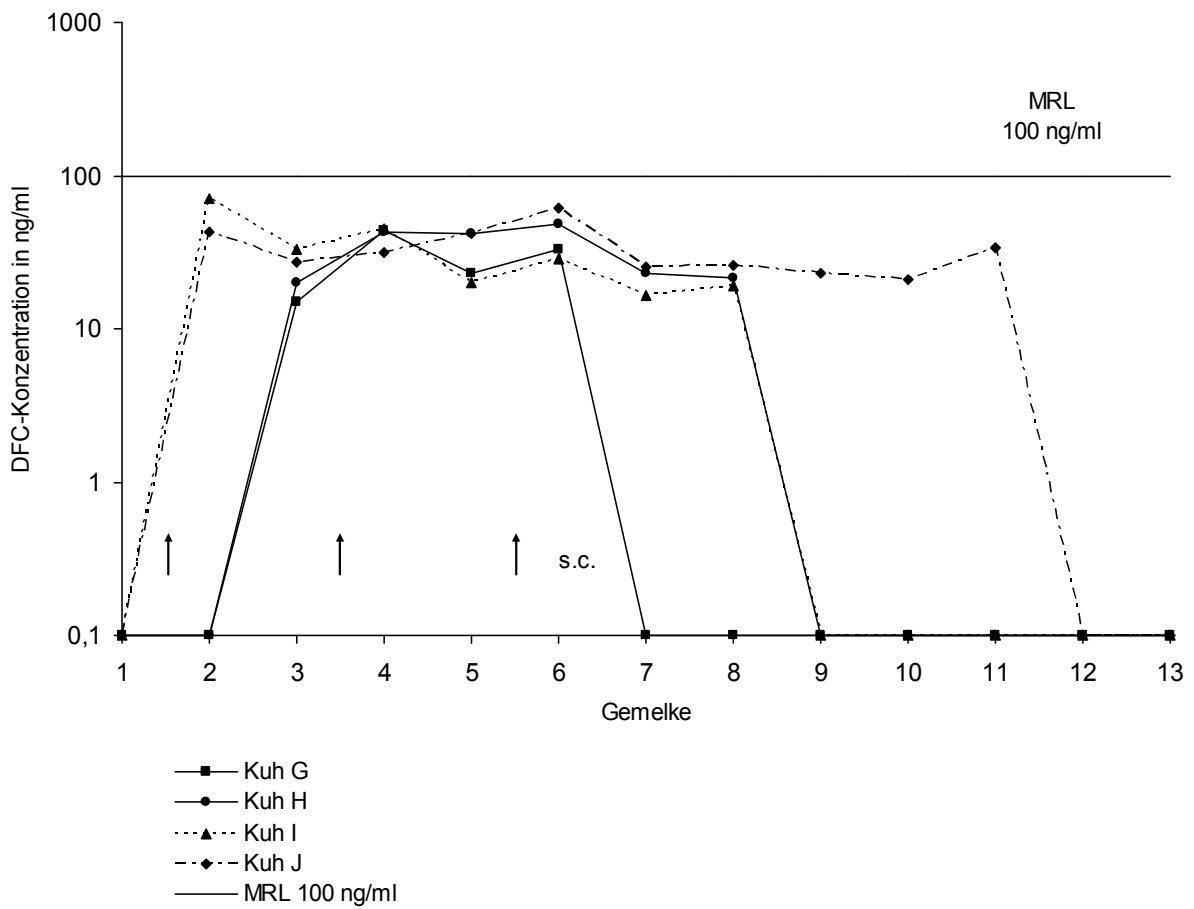


Abbildung 4.7: Vergleich des Ausscheidungsverlaufs von DFC in Sammelmilchproben von 4 Kühen (Kuh G, Kuh H, Kuh I und Kuh J) nach therapeutischer Applikation von 750 mg Cefotiofur s.c., einmal täglich über drei Tage (↑). Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle vor Behandlungsbeginn.

Tabelle 4.9: Cefotiofur-Rückstandsgehalte in Sammelmilchproben von 4 Tieren (Kuh G, Kuh H, Kuh I und Kuh J) nach systemischer Applikation von 750 mg Cefotiofur s.c., einmal täglich über drei Tage.

DFC-EIA Ergebnis (ng/ml) und visuelles Ergebnis des BRT-P in Milchprobe von											
Applikationsform, Gemelk Nr.	Kuh G		Kuh H		Kuh I		Kuh J				
	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	EIA	BRT-P	
1*	<25	-	<25	-	<25	-	<25	-	<25	-	
s.c.											
2	<25	-	<25	-	71,4	-	42,4	-	42,4	±	
3	14,9	-	19,9	-	32,6	-	27,1	-	27,1	±	
s.c.											
4	43,9	-	42,8	-	44,9	-	31,6	-	31,6	-	
5	22,8	-	41,6	-	20,0	-	42,1	-	42,1	±	
s.c.											
6	32,6	-	48,8	-	28,9	-	60,6	-	60,6	+	
7	<25	-	23,3	-	16,6	-	25,4	-	25,4	-	
8	<25	+	21,6	-	19,2	-	25,9	-	25,9	-	
9	<25	-	<25	-	<25	-	23,1	-	23,1	-	
10	<25	-	<25	-	<25	-	21,1	-	21,1	-	
11	<25	-	<25	-	<25	-	33,4	-	33,4	-	
12	<25	-	<25	-	<25	-	<25	-	<25	-	
13	<25	-	<25	-	<25	-	<25	-	<25	-	

* Gemelk Nr. 1 entspricht der Negativkontrolle vor Behandlungsbeginn

5 DISKUSSION

β -Laktam-Antibiotika werden seit Jahrzehnten in der veterinärmedizinischen Praxis eingesetzt. Sie sind bei Milchkühen nach wie vor die wichtigste Antibiotika-Gruppe. In den letzten Jahren nahm die Bedeutung der Cephalosporine vor allem in der antimikrobiellen Therapie bei Milchkühen deutlich zu. Einer der Hauptgründe hierfür ist die kurze Wartezeit der Präparate bei gleichzeitig guter Wirksamkeit. Die Cephalosporine Cefquinom und Ceftiofur sind in mehreren Produktvarianten auf dem deutschen Arzneimittelmarkt vertreten und werden unter anderem zur Behandlung von Mastitiden, Klauen- und Gliedmaßenkrankungen sowie von Endometritis eingesetzt.

Bei Tieren, die der Milchgewinnung dienen, ist eine Antibiotika-Therapie mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten verbunden, auch aufgrund der Wartezeiten. Jeder Tag Wartezeit bedeutet je nach Milchleistung 5-10 Euro Milchgeldverlust. Präparate mit kurzen Wartezeiten bieten diesbezüglich große Vorteile.

Nach Verordnung (EU) 37/10 werden für die Wirkstoffe Höchstmengen, Maximum Residue Limits (MRLs), für Tierarzneimittelrückstände festgelegt. Ausgehend von diesem MRL-Wert und einem bestimmten Sicherheitsfaktor werden die Wartezeiten für jedes Präparat festgelegt. Sie dienen zum einen dem Schutze des Verbrauchers vor gesundheitlichen Risiken, zum anderen auch zur Sicherstellung der technologischen Qualität von Milch bei der Herstellung und Verarbeitung von fermentierten Milchprodukten. Die dieser Abschätzung zugrunde liegenden Ausscheidungsversuche werden in der Regel jedoch nicht veröffentlicht, da sie Bestandteil der vertraulichen Antragsunterlagen des Herstellers sind.

Obwohl Cefquinom und Ceftiofur mittlerweile zu den bei laktierenden Kühen mit am häufigsten eingesetzten Antibiotika gehören dürften, sind kaum Daten zur Ausscheidung bzw. Ausscheidungsdauer von Rückständen in Milch publiziert worden. Zwar müssen im Rahmen des Zulassungsverfahrens eines Arzneimittels für jede lebensmittelliefernde Spezies sowohl Untersuchungsverfahren als auch Daten zur Rückstandsbildung und Ausscheidungsdauer bei der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) eingereicht werden. Allerdings werden diese Daten aus Wettbewerbsgründen nicht veröffentlicht, mit Ausnahme einiger rudimentärer Angaben in den jeweiligen „MRL Summary Reports“.

Zudem sind alle bisher publizierten Daten bei gesunden Tieren gewonnen worden. Da aber das Ausscheidungsverhalten bei klinisch erkrankten Tieren durchaus variieren kann, ist die Durchführung entsprechender Ausscheidungsversuche unter Praxisbedingungen an klinisch erkrankten Tieren sinnvoll. Dieses war ein wesentliches Ziel der vorliegenden Studie.

Weiterhin konnte so beispielsweise für Cefquinom die in der Praxis tatsächlich durchgeführte kombinierte intramammäre und intramuskuläre Applikationsform bezüglich ihrer Auswirkung auf die Ausscheidung von Rückständen geprüft werden. Auch dies wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Zum anderen stellt sich insbesondere für Cefquinom, mit Einschränkungen aber auch für Ceftiofur bzw. den Metaboliten Desfuroylceftiofur, die Problematik, dass keine praktikablen Routinetests mit ausreichender Empfindlichkeit zur Verfügung stehen. Daher sollten in dieser Arbeit die in vorhergehenden Studien entwickelten Enzymimmuntests validiert und eingesetzt werden.

Gleichzeitig steht seit kurzem ein verbesserter mikrobiologischer Nachweis auf Basis des Brillantschwarz-Reduktionstests zur Verfügung (BRT-P), mit dem beide Verbindungen erstmals auf MRL-Niveau in Milch erfasst werden können. Eine parallele Untersuchung mittels quantitativen Enzymimmuntest und qualitativem BRT-P, sowie teilweise mittels eines qualitativen Rezeptortests (β -s.t.a.r.) konnte zudem eine wechselseitige, auch auf Plausibilität beruhende Validierung der Tests erreicht werden.

5.1 Nachweis von Cefquinom-Rückständen in der Milch nach therapeutischer Applikation

Zur Prüfung des Rückstandsverhaltens von Cefquinom in Milch nach therapeutischer Applikation wurden Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen und trocken gestellten Kühen untersucht. Fünf Tiere wurden jeweils systemisch und lokal mit zwei Cefquinom-Präparaten behandelt, zwei weitere Tiere wurden mit einem Cefquinom-haltigen Präparat trocken gestellt.

Während der Behandlung der an Mastitis erkrankten Tiere wurden in dem jeweils intramammär behandelten Viertel sowohl mittels mikrobiologischen Tests als auch mittels Enzymimmuntests hohe Cefquinomgehalte in Konzentrationen von mehreren zehn Mikrogramm je ml nachgewiesen. Die Gehalte sanken allerdings nach der letzten Applikation rasch und lagen spätestens ab dem vierten Tag nach Behandlungsende unterhalb der zulässigen Rückstandshöchstmengen von 20 ng/ml. Die Wartezeit von fünf Tagen auf Milch erwies sich somit in allen Fällen als ausreichend.

Die erzielten Ergebnisse decken sich mit den Angaben von KIETZMANN (2004) bzw. von KNAPPSTEIN et al. (2005), die nach „ordnungsgemäßer“ intramammärer Applikation von Cefquinom bei gesunden Kühen ebenfalls keine Rückstände oberhalb des MRL-Wertes innerhalb der Wartezeit festgestellt hatten.

Nach alleiniger intramuskulärer Applikation des Cefquinom-Präparates konnten bereits nach zwölf Stunden keine Rückstände oberhalb des MRL gemessen werden.

Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Milchproben von Tieren untersucht, die mit einer Kombinationstherapie behandelt worden waren. Dennoch können die Ergebnisse für Kuh E mit anderen Literaturangaben verglichen werden.

Bei Kuh E wiesen die Milchproben der drei nicht lokal mit Euterinjektoren behandelten Viertel noch innerhalb des Behandlungszeitraums stets Cefquinom-Konzentrationen unterhalb des MRL-Niveaus auf (Tabelle 4.5). Ein Maximalwert von 18,2 ng/ml wurde gemessen. Betrachtet man wiederum die Ergebnisse aller vier Viertel in der Sammelprobe, so sind die Cefquinom-Konzentrationen niedriger als in den Einzelproben des lokal behandelten Viertels, aber deutlich höher als die Einzelwerte der gesunden Viertel (Tabelle 4.5). Dieses Verhalten beobachteten auch OLIVER et al. (1990).

Die Testergebnisse belegen zudem, dass nach intramammärer Applikation von Cefquinom in ein Euterviertel ein Übergang in die übrigen Euterviertel nur in sehr geringer Konzentration erfolgt.

Nimmt man an, dass die Rückstände in den drei gesunden, unbehandelten Vierteln von der intramuskulären Injektion stammen, stellt sich die Frage, ob die ermittelten

Wirkstoffkonzentrationen überhaupt ausreichend für einen Therapieerfolg sind, oder ob eine alleinige lokale Therapie, die für deutlich höhere Konzentrationen verantwortlich ist, schon ausreichen würde. EHINGER et al. (2006) bestätigten in einer Studie mit Cefquinom, dass es nach einer systemischen Gabe in allen Drüsenbereichen des Euters zu einer relativ einheitlichen Anreicherung des Wirkstoffs kommt, die allerdings niedriger ist als nach einer lokalen intramammären Applikation. Die höchsten Cefquinom-Konzentrationen im Eutergewebe werden aber am schnellsten (bereits zwei Stunden nach der ersten Applikation) nach der kombinierten Anwendung der Cefquinom-Präparate erreicht. Die Kombinationstherapie führt zu einer deutlich höheren Heilungsrate (SHPIGEL und SCHMID 1997; SHPIGEL et al. 1997; EHINGER et al. 2006; INTERVET 2007).

Nicht nur eine ordnungsgemäße Applikation ist für die Ausscheidung von Cefquinom entscheidend, sondern auch die Lagerung des Arzneimittels. Die Präparate, mit denen die Tiere im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurden, wurden trocken und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Erhöhte Rückstandskonzentrationen von intramammär appliziertem Cefquinom nach Ablauf der Wartezeit, wie sie von KNAPPSTEIN et al. (2005) ermittelt wurden, konnten in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Die von KNAPPSTEIN et al. (2005) berichteten „Ausreißer“-Werte (hohe und lange anhaltende Rückstandskonzentrationen) waren nach Angaben der Autoren auf eine unsachgemäße Lagerung der Euterinjektoren über eine Temperatur von 30° C zurückzuführen.

Die qualitativen Ergebnisse des verbesserten Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT-P) waren vor allem im Konzentrationsbereich ab circa 40 ng/ml konsistent mit den quantitativen Ergebnissen des Cefquinom-EIAs. Bei Konzentrationen von 40 ng/ml wurden für einige Proben aber auch starke Abweichungen registriert. So waren die Ergebnisse des BRT-P beispielsweise bei Kuh B (Tabelle 4.2) in Gemelk Nr. 10 bei einer mit EIA ermittelten Cefquinom-Konzentration von 37,5 ng/ml negativ, wohingegen in Gemelk Nr. 17 im BRT-P ein fragliches Ergebnis („±“) einer mittels EIA festgestellten Konzentration von knapp 15 ng/ml gegenüber stand.

Trotz dieser Unterschiede weist der BRT-P, im Vergleich zu allen anderen Hemmstofftests, eine bessere Nachweisempfindlichkeit für Cephalosporine auf und scheint damit ein geeignetes Verfahren insbesondere zum Nachweis von Cefquinom-Rückständen zu sein. Die Sensitivität des BRT-Ps ist um 3-4 höher als im herkömmlichen BRT der Firma AiM

(Analytik in Milch GmbH, München), der einen Nachweis von Cefquinom in Konzentrationsbereichen zwischen 100-200 ng/ml ermöglicht (THAL et al. 2010; KLOTH 2011)

Bei allen der fünf geprüften Tiere stimmten nach Ablauf der Wartezeit die Ergebnisse des Enzymimmuntest mit denen des mikrobiologischen Verfahrens überein.

Schlussfolgernd ergaben sich für Cefquinom auch nach kombiniertem intramuskulären und intramammären Einsatz bei klinisch kranken Kühen keine Hinweise darauf, dass nach Ablauf der Wartezeit mit Rückständen gerechnet werden muss.

Da der Nachweis von Cefquinom mittels EIA auf einem extrem niedrigen Konzentrationsniveau von weniger als 10% des MRLs erfolgte, deuten diese Daten auf ein hohes Maß an Sicherheit vor unerwünschten Rückständen hin, sofern die Wartezeit eingehalten wird.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurde die Ausscheidung von Cefquinom nach Einsatz als Trockensteller geprüft. Die Milchproben der Kühe A_{TS} und B_{TS} wurden nach dem Einsatz eines Cefquinom-Präparates zum Trockenstellen vergleichend mit dem β -s.t.a.r., dem BRT-P und dem Cefquinom-EIA untersucht. Die Trockenstehperiode reichte von 61 Tagen bei Kuh A_{TS} bis zu 77 Tagen bei Kuh B_{TS}. Daraus ergab sich gemäß Packungsbeilage (Gebrauchsinformation des Herstellers) eine Wartezeit von einem Tag für Milch, da die Trockenstehzeit länger als 5 Wochen andauerte.

Die im enzymimmunologischen Testverfahren erhaltenen Ergebnisse ergaben einen Höchstwert von knapp 15 ng/ml Cefquinom im ersten Gemelk nach der Kalbung bei Kuh A_{TS}. Alle weiteren Proben wiesen sehr niedrige bis gar keine Rückstände auf. Eine Ausscheidung von Cefquinom in Milch über die vorgeschriebene Wartezeit von einem Tag und den zulässigen MRL-Wert von 20 ng/ml wurde, in beiden Fällen, nicht festgestellt. Bei diesen Ergebnissen ist zudem zu berücksichtigen, dass aufgrund der Kolostralphase ohnehin ein Ablieferungsverbot von 5 Tagen besteht, so dass eine zusätzliche Sicherheit gegeben ist.

Auffällig waren in dieser Versuchsreihe die abweichenden Testergebnisse im Rezeptorbindungstest und im mikrobiologischen Nachweisverfahren. Während der β -

s.t.a.r. nur im ersten Gemelk nach Applikation positive Werte ergab, bei EIA-Messwerten im Bereich von 10-15 ng/ml, wurde mittels BRT-P auch in späteren Gemelken (Kuh A_{TS}, Gemelk Nr. 6 und 7, d. h. am dritten und vierten Tag nach der Kalbung; Tabelle 4.6), zumindest Hemmstoff-fragliche Ergebnisse erzielt. Dies dürfte mit einer Beeinflussung des BRT-P durch die von reifer Milch unterschiedliche Zusammensetzung dieser Kolostralmilchähnlichen Gemelke der Tiere zurück zuführen sein.

In der Literatur wird auf eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse der mikrobiologischen Verfahren durch eine veränderte Milchezusammensetzung hingewiesen (OLIVER et al. 1984; CARLSSON und BJÖRCK 1987; SUHREN und HEESCHEN 1987 b, 1990; VAN EENENNAAM et al. 1993; ANDREW et al. 1997; SCHENCK und CALLERY 1998; NEAVES 1999; ANDREW 2000; FABRE 2006; SUHREN und KNAPPSTEIN 2007). Aber auch Rezeptorbindungstests können durch Milchhaltsstoffe nachteilig beeinflusst werden (CULLOR 1993; VAN EENENNAAM 1993; ANDREW et al. 1997; SUHREN und REICHMUTH 1998 b; SUHREN und HEESCHEN 1990; ANDREW 2000; SUHREN und KNAPPSTEIN 2007).

CARLSSON und BJÖRCK (1987) untersuchten den Einfluss von Lysozym und Lactoferrin auf den Testkeim *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis*. Erhöhte Lysozym-Werte finden sich nicht nur in Milch von an Mastitis erkrankten Tieren, sondern auch im Kolostrum. Ähnlich verhält es sich für das eisenbindende Protein Lactoferrin, das in Kolostralmilch und während den ersten Tagen einer Infektion in erhöhtem Maße im Milchsekret zu finden ist. Die Untersuchungen ergaben bei einer synergistischen Wirkung von Lysozym und Lactoferrin eine Hemmung der Sporen von *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis*.

SUHREN und HEESCHEN (1990) konnten keine Beeinflussung im Brillantschwarz-Reduktionstest durch Lactoferrinzugabe zu Milch beobachten, allerdings wurde das Testverfahren durch Lysozym (>5µg/ml) deutlich beeinflusst.

Ein Ausschluss falsch-positiver Resultate durch einen oder beide Faktoren kann somit für den BRT-P nicht vollkommen ausgeschlossen werden und könnte eine mögliche Erklärung für die fraglichen Ergebnisse sein.

SUHREN und KNAPPSTEIN (2007) beobachteten den Zusammenhang zwischen „falsch verdächtigen oder positiven“ Ergebnissen und der Anzahl der Laktationstage. In mikrobiellen Hemmstofftests mit *Geobacillus stearothermophilus* als Testkeim nahm mit der Anzahl der Laktationstage nach der Kalbung die Anzahl falsch verdächtiger oder falsch positiver Proben ab. Der Einfluss des Laktationsstadiums war in Testsystemen mit Brillantschwarz als Indikator besonders ausgeprägt. Milchproben von Einzeltieren weisen zudem häufiger falsch positive Ergebnisse auf, als Sammelproben von vielen Tieren (VAN EENENNAAM et al. 1993; MUSSER und ANDERSON 1999).

Zusammenfassend ist für den Einsatz von Cefquinom als „Trockensteller“ jedoch festzustellen, dass bei beiden Tieren selbst in der Kolostralmilchphase keine Überschreitung des MRLs vorlag. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in der Kolostralmilchphase von 5 Tagen ohnehin keine Milch abgeliefert werden darf, ist also auch hier eine hohe Anwendungssicherheit gegeben. Dies gilt jedoch nicht für Tiere, die vorzeitig Abkalben, wie dies im nächsten Abschnitt (5.2) erläutert wird.

5.2 Nachweis von Desfuroylceftiofur-Rückständen in der Milch nach therapeutischer Applikation

Zur Untersuchung des Nachweises von Desfuroylceftiofur-Rückständen in Milch wurden von fünf Tieren nach Behandlung mit einem Ceftiofur-Präparat Milchproben gewonnen und sowohl mit dem modifizierten Brillantschwarz-Reduktionstest der Firma AiM (Analytik in Milch GmbH, München), als auch mit dem von MEIER (2008) entwickelten Desfuroylceftiofur-EIA untersucht.

Dieser Test beruht letztlich auf Antikörpern gegen Ceftiofur, die jedoch eine Kreuzreaktion von rund 5% mit Desfuroylceftiofur aufweisen. Da Ceftiofur als Muttersubstanz nach parenteraler Applikation nicht in die Milch übergeht, kann dieser Test bei bekannter Applikationsroute zur Quantifizierung von DFC in Milch eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze von DFC in Milch liegt bei cirka 25 ng/ml, d.h. deutlich unterhalb des MRL.

Für die subkutan mit Ceftiofur behandelten Tiere (Kuh G, H, I und J) wurden zu keinem Zeitpunkt während und nach der Behandlung Rückstände von DFC über dem MRL-Wert von

100 ng/ml gemessen (Abbildung 4.7). Die höchste Konzentration von 71,40 ng/ml wurde während des dreitägigen Behandlungszeitraumes ermittelt. Bei drei Tieren waren am zweiten Tag und bei einem Tier am dritten Tag nach der letzten Ceftiofur-Applikation keinerlei Rückstände im enzymimmunologischen Verfahren nachweisbar.

Die eigenen Ergebnisse decken sich hierbei mit denen in der Literatur zu findenden Untersuchungen und Ergebnissen (JAGLAN et al. 1992; TYCZKOWSKA et al. 1993; ERSKINE et al. 1995; EMEA 1999; BROWN et al. 2000).

Voraussetzung für die Rückstandsfreiheit ist nach MÄRTLBAUER (o. J.), TYCZKOWSKA et al. (1993), BAUMGARTNER (2002), KERP et al. (2003), SMITH et al. (2004) und MAKESWARAN et al. (2005) die fachgemäße Applikation des Arzneimittels. Bei laktierenden Kühen ist lediglich eine subkutane Injektion von Ceftiofur-haltigen Präparaten erlaubt. Bei intramammärer Applikation von Ceftiofur würde es zum einen kaum verstoffwechselt, zum anderen wären Rückstandskonzentrationen weit oberhalb des MRL-Wertes zu erwarten. Dies scheint in der Praxis allerdings gelegentlich durchaus vorzukommen, wodurch sich vereinzelte positive Ceftiofur-Befunde in Anlieferungsmilch erklären lassen (KRESS et al. 2007).

Zusammenfassend wurde für Ceftiofur bei klinisch kranken Kühen festgestellt, dass nach subkutaner Applikation nur geringe DFC-Konzentrationen unterhalb des MRL feststellbar waren. Einen Sonderfall stellte Kuh F dar (Tabelle 4.8 und Abbildung 4.6). Lediglich bei Kuh F wurden erhöhte Rückstandskonzentrationen von DFC nachgewiesen. Ein Rückschluss auf eine nicht ordnungsgemäße Applikation konnte in diesem Fall nicht gezogen werden, da eine Vorbehandlung mit einem Cefquinom-Präparat erfolgt war und zudem das Tier sehr schlechtes Allgemeinbefinden nach einer Totgeburt zeigte. Das Tier wurde dreizehn Tage vor Behandlungsbeginn mit einem Cefquinom-Präparat trocken gestellt, aufgrund der frühzeitigen Totgeburt war daher eine Wartezeit von weiteren 23 Tagen einzuhalten. Die Quantifizierung von Cefquinom und von DFC mittels EIA ergab für Tier F jeweils Ergebnisse, die stark von denen der anderen Tiere abwichen.

Der DFC-EIA ergab hier erhöhte Konzentrationen von DFC, mit Maximalwerten von über 230 ng/ml und damit über dem MRL. Dies wird prinzipiell bereits auch in früheren Studien

gezeigt, in denen klinisch erkrankte Tiere höhere Messwerte als gesunde Tiere aufwiesen (ERSKINE et al. 1995, OKKER et al. 2002, WASHBURN et al. 2005).

Eine Erklärung für den Messwert von knapp 91 ng/ml in der Negativprobe (Gemelk Nr. 1) von Kuh F konnte nicht gefunden werden. Auch eine Laborkontamination kann für diese Probe nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse des Cefquinom-EIA zeigen, dass über den gesamten Probennahme-Zeitraum eine Konzentration von 20 ng/ml nur gegen Ende des Probennahmezeitraums knapp unterschritten wurde. Eine Rückstandsfreiheit auf MRL-Niveau für die Milch von Kuh F war nicht gegeben.

Eine mögliche Kreuzreaktion zwischen den beiden Enzymimmuntests ist auszuschließen. Sowohl THAL (2006), als auch MEIER (2008) widerlegten in ihren Arbeiten eine relative Kreuzreaktion mit dem jeweiligen Antibiotikum für die entwickelten Enzymimmuntests.

MEIER (2008) untersuchte in ihrer Arbeit unter anderem die relative Kreuzreaktion des für den DFC-Enzymimmuntest verwendeten Antiserums von Kaninchen 06 mit anderen β -Laktam-Antibiotika. Es wurde keine Hemmung durch Cefquinom in einer Konzentration bis zu 0,1 mg/ml beobachtet, eine Kreuzreaktion ist auszuschließen.

Die Überprüfung der Spezifität des Cefquinom-EIA von THAL (2006) erbrachte mit Ceftiofur bei einer getesteten Konzentration von 1 μ g/ml keine kompetitive Inhibition. Das verwendete Antiserum von Kaninchen 17 ist daher hochspezifisch für Cefquinom. Auch im DFC-EIA reagiert Cefquinom nicht. Auch ROSE et al. (1995) konnten in einem speziell für den Nachweis von Ceftiofur und Desfuroylceftiofur entwickelten kompetitiven indirekten Enzymimmuntest Kreuzreaktionen mit anderen strukturverwandten Cephalosporinen ausschließen.

Über eine mögliche Beeinflussung des DFC-EIA durch die übrigen angewendeten Medikamente (Schmerzmittel, Cortison) liegen keine Daten vor.

Die Ergebnisse von Kuh F verdeutlichen daher, wie wichtig die Einhaltung der Wartezeit ist. Auch wenn zur Behandlung der Endometritis ein Präparat mit null Tagen Wartezeit auf Milch

eingesetzt wurde, muss ein vorheriger Einsatz eines anderen Wirkstoffs, wie hier der eines Trockenstellers, ebenfalls berücksichtigt werden.

Die erhaltenen Messwerte zeigen, wie riskant eine Ablieferung der Milch solcher Tiere innerhalb der Wartezeit wäre, da sich das Ausscheidungsverhalten innerhalb von nur zwölf Stunden verändern kann (Tabelle 4.8 und Abbildung 4.6, Kuh F, Gemelke Nr. 11, Nr. 12 und Nr. 13). Schwankungen der Rückstandskonzentrationen innerhalb des Probenahmezeitraums wurden auch für DFC beobachtet. Gemelksproben mit niedrigen Rückstandswerten oder negativen Ergebnissen, folgten Proben mit höheren Konzentrationen oder fraglichen bis positiven Ergebnissen (Kuh F und J, Tabellen 4.8 und 4.9).

An dieser Stelle sei auf das in der Literatur bereits beschriebene Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur verwiesen (JAGLAN et al. 1992; BECONI-BARKER et al. 1995 a; BECONI-BARKER et al. 1996; SALMON et al. 1996; BROWN et al. 1999; OKKER et al. 2002; HORNISH et al. 2003; KROKER, 2006). Ceftiofur wird rasch zu DFC und anderen Metaboliten umgewandelt, die im Plasma und Gewebe größtenteils an Proteine gebunden vorliegen. Die Biotransformation in die jeweiligen Metaboliten und die Proteinbindung sind reversible Prozesse. Alle DFC-Metaboliten können so jederzeit mikrobiologisch aktiv werden, was eine Versorgung mit DFC über einen längeren Zeitraum gewährleistet (BECONI-BARKER et al. 1996).

Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass bei Einhaltung einer ordnungsgemäßen subkutanen Applikation des Ceftiofur-Präparates keine Rückstandsmengen oberhalb des MRL-Niveaus zu finden sind. Gerade bei einer vorausgegangenen anderweitigen Therapie empfiehlt sich die Durchführung eines Hemmstofftests.

Der BRT-P stellt hier eine recht gute Methode zum Nachweis von Cefquinom und Ceftiofur bzw. DFC-Rückständen dar, er ist derzeit wahrscheinlich das einzige mikrobiologische Routineverfahren, mit dem beide Verbindungen auf MRL-Niveau nachgewiesen werden können. Die enzymimmunologischen Verfahren für DFC bzw. für Cefquinom sind aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit des spezifischen Nachweises gut geeignet für Ausscheidungsstudien sowie zur Absicherung positiver Ergebnisse des BRT-P. Der Rezeptortest (β -s.t.a.r.) erfasst ebenfalls beide Wirkstoffe mit ausreichender

Empfindlichkeit und kann als Schnelltest zur Überprüfung auch vor Ort am Einzeltier durchaus empfohlen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis der β -Laktamantibiotika Cefquinom und Ceftiofur in Milch von Kühen nach therapeutischer Applikation aufgrund einer klinischen bakteriellen Infektion. Zum Wirkstoff- bzw. Rückstandsnachweis wurden Enzymimmuntests (EIA) eingesetzt, zum einen ein EIA für Cefquinom, zum anderen ein EIA zum Nachweis des Ceftiofur-Metaboliten Desfuroylceftiofur (DFC). Mit diesen Tests wurden Nachweisgrenzen für Cefquinom von 1,5 ng/ml und für DFC von 25 ng/ml erreicht, was jeweils deutlich unterhalb der entsprechenden Höchstmengen (MRL) für diese Stoffe lag (Cefquinom: 20 ng/ml, DFC: 100 ng/ml). Weiterhin wurde ein verbessertes mikrobiologisches Verfahren auf der Basis des Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT-P) zum qualitativen Hemmstoffnachweis eingesetzt. Die Nachweisgrenzen für Cefquinom (ca. 20 ng/ml) und DFC (ca. 50-100 ng/ml) lagen auch hier im Bereich der Höchstmengen. Für den Nachweis von Cefquinom wurde zusätzlich ein qualitativer Rezeptortest (β eta-s.t.a.r.) eingesetzt, die Nachweisgrenze lag bei 10 ng/ml.

Insgesamt wurden von 12 Milchkühen 329 Milchproben in die Enzymimmuntests für Cefquinom und Desfuroylceftiofur eingesetzt und untersucht, 252 Milchproben im BRT-P und 118 Milchproben im Rezeptortest.

Fünf Kühe wurden aufgrund einer klinischen Mastitis gleichzeitig intramuskulär und zusätzlich auf dem betroffenen Viertel intramammär über drei Tage hinweg mit Cefquinom behandelt. Es zeigten sich für das intramammär behandelte Viertel im Behandlungszeitraum hohe Rückstandsgehalte von bis zu 27 μ g/ml, während in den übrigen Eutervierteln die Rückstands-Konzentrationen für Cefquinom deutlich unterhalb des MRL lagen. Zum Ablauf der Wartezeit wurden in keinem Fall Rückstände oberhalb des MRL festgestellt.

Zwei Kühe wurden unter Einsatz einer intramammären Applikation eines Cefquinom-haltigen Präparats trockengestellt. Bereits das erste Gemelk post partum (>35 Tage nach Trockenstellen) wies nur noch geringe Cefquinom-Gehalte im Bereich des MRL auf, nach Ablauf der Wartezeit (1 Tag) bzw. nach Ende der Kolostralmilch-Wartezeit (5 Tage) waren nur noch Spuren bzw. keine (<1,5 ng/ml) Rückstände von Cefquinom messbar.

Vier Kühe wurden aufgrund bakterieller Infektionen (ohne Beteiligung des Euters) jeweils über drei Tage hinweg subkutan mit Ceftiofur behandelt. Die in einzelnen Sammelmilchproben im Behandlungszeitraum gemessenen DFC-Gehalte lagen bei 25-70 ng/ml, damit unterhalb der Höchstmenge. Maximal drei Tage nach Behandlungsende waren keine DFC-Rückstände mehr feststellbar (<25 ng/ml).

Ein Tier das Cefquinom in Form eines Trockenstellerpräparats erhalten hatte, dann jedoch vorzeitig (10 Tage nach Applikation des Trockenstellerpräparates) abkalbte, wurde nach der Geburt (3 Tage post partum) aufgrund einer Endometritis zusätzlich mit Ceftiofur subkutan behandelt. Bei diesem Tier lagen die Gehalte sowohl an DFC als auch an Cefquinom teilweise über dem MRL-Niveau.

Grundsätzlich zeigten die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen, dass sowohl für Cefquinom als auch für Ceftiofur bzw. DFC bei vorschriftsmäßiger Anwendung an klinisch erkrankten Kühen keine „unerlaubten Rückstände“ in der Milch zu erwarten sind, ja dass die MRL-Konzentrationen im Normalfall sogar deutlich vor Ablauf der Wartezeit unterschritten werden. Bei kombinierter mehrfacher Applikation verschiedener Präparate in Verbindung mit schweren Störungen des Allgemeinbefindens des behandelten Tieres ist jedoch mit erhöhten Rückstandskonzentrationen in Milch über einen längeren Zeitraum zu rechnen.

Der Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Enzymimmuntests mit den qualitativen Befunden des mikrobiologischen Tests (BRT-P) und – nur für Cefquinom durchgeführt – des Rezeptortests (β eta-s.t.a.r.) ergab eine zufriedenstellende Übereinstimmung. Lediglich im Bereich der Nachweisgrenze des BRT-P wurden häufiger diskrepante Befunde erzielt. Der BRT-P ist dennoch das erste mikrobiologische Routineverfahren, mit dem Rückstände von Cefquinom und Desfuoylceftiofur auf MRL-Niveau nachweisbar sind. Der Rezeptortest ist zum Nachweis von Cefquinom auf MRL-Niveau auch beim Einzeltier geeignet.

7 SUMMARY

The present thesis focusses on the detection of the β -lactameantibiotics cefquinome and ceftiofur in milk of cows after therapeutic application due to a clinical bacterial infection. Specific enzyme immunoassays (EIA) were performed to detect and quantify cefquinome and desfuroylceftiofur (DFC), a compound occurring during ceftiofur metabolism. The detection limits of 1,5 ng/ml for cefquinome and 25 ng/ml for DFC obtained in these tests fall far below the respective maximum residue limits (cefquinome: 20 ng/ml, DFC: 100 ng/ml). Apart from this, an improved microbiological procedure based on the brilliant black reduction test (BRT-P) for a qualitative detection was employed. In this case the detection limits for cefquinome (ca. 20 ng/ml) and DFC (ca. 50-100 ng/ml) resembled the values for the maximum residue limits. In addition, a qualitative receptor test (β eta-s.t.a.r.) was applied to detect cefquinome. Here, the detection limit was 10 ng/ml.

In total, 329 milk samples taken from 12 milk cows were analyzed in the enzyme immunoassays for cefquinome and DFC, from which 252 samples were examined via BRT-P and 118 via the receptor test.

Due to a clinical mastitis, five cows were treated for three days with cefquinome intramuscularly as well as intramammary at the infected udder quarter. The intramammary treated area showed high amounts of residual cefquinome up to 27 μ g/ml, whereas only low concentrations below the MRL were measured for the other parts.

Two cows were dried up via intramammary treatment with cefquinome. Already the first raw milk post partum (>35 days after treatment) displayed very low concentrations of cefquinome in the range of the MRL. After expiration of the withdrawal period (one day) and after the waiting time for kolostral milk (5 days) only very marginal residues of cefquinome or no amounts, respectively, were detectable (<1,5 ng/ml).

Four cows were treated for three days subcutaneously with ceftiofur due to a bacterial infection aside of the udder. The amounts of DFC in the different milk samples taken during this treatment added up to 25-70 ng/ml and were therefore below the maximum residue limits. Three days after ending the treatment at most, the amounts of DFC were undetectable (<25 ng/ml).

A cow, that has been dried up with cefquinome but calved ahead of time (10 days), was treated due to endometritis subcutaneously with ceftiofur after the calf's birth. In this case, cefquinome as well as DFC amounts partially exceeded the MRL.

Generally, the results indicated, that neither for cefquinome nor for ceftiofur any forbidden residual amounts were detectable in the milk after an application as prescribed. Usually the values after expiration of the withdrawal period clearly fell below the MRL concentrations. However, if treated simultaneously and repeatedly with several compounds while the animal is suffering from difficult disfunctions of the general condition, high residual concentrations can be expected over a longer time period.

A comparison between the quantitative results of the enzyme immunoassay (EIA) with the qualitative conclusions of the microbiological tests (BRT-P) and – only performed for cefquinome – of the receptor tests (β -s.t.a.r.) showed a satisfying consistency. Only close to the detection limit for BRT-P several divergent results were obtained. Nevertheless, the BRT-P is the first microbiological routine procedure, that can be applied to detect residual amounts of cefquinome and desfuroylceftiofur at MRL. The receptor test is applicable to verify cefquinome amounts at MRL also in individual animals.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Anonyme Schriften

ANONYM (1994):

Ein neuer Test von IDEXX erleichtert den Nachweis von Beta-Lactam-Antibiotika.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 16, 806–807

ABOUZIED, M., M. SARZYNSKI, A. WALSH, H. WOOD und M. MOZOLA (2009):

Validation study of a receptor-based lateral flow assay for detection of beta-lactam-antibiotics in milk.

J. AOAC Int. 92, 959–974

ADR (Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V.), Bonn (2008):

Rinderproduktion – Zucht, Besamung, Leistungsprüfung in Deutschland 2007.

ADR, Bonn

AIM (AiM – Analytik in Milch GmbH), München (2010):

Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT).

AiM Analytik in Milch, München, Produktinformation (Stand 10/2010)

[Internet: http://www.aim-bayern.de/pdf/BRT_Produktinformation10_2010.pdf], letzter Zugriff Juni 2012

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

ANDREW, S.M. (2000):

Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening test.

J. Dairy Sci. 83, 2992–2997

BAUMGARTNER, C. (2002):

Antibiotika mit 0 Tage Wartezeit für Milch? Gibt's das?

BbT Amtstierärztlicher Dienst u. Lebensmittelkontrolle 9, 313

BAUMGARTNER, C. (2008):

Rückstände von Antibiotika in der Milch – Es wird ernst!

MPR (Milchprüfring) Bayern e.V., Wolnzach

[Internet: http://www.mpr-bayern.de/3.1/mpr.de/data/media/2661/MilchPur_Website.pdf],

letzter Zugriff Juni 2012

BAUMGARTNER, C. (2009):

Hemmstoffe sicher identifizieren – ein neuer integrierter Ansatz unter Einsatz eines Biosensors.

[Internet: http://www.mpr-bayern.de/.../Vortrag%20Baumgartner_Praxisseminar%2009.pdf],

letzter Zugriff Juni 2012

BAUMGARTNER, C., K. KLOTH und B. KREIS (2010):

Antibiotika-Rückstände in der Anlieferungsmilch sicher erkennen – Neuer Ansatz für ein integriertes Kontrollsystem mit Hilfe eines BioSensor-Systems.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 14, 23–27

BECKER, M., E. ZITTLAU 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

BECKER, M., E. ZITTLAU und M. PETZ (2004):

Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Anal. Chim. Acta 520, 19–32

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 (1995 a):

[¹⁴C] 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 (1995 b):

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 (1996):

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 Drugs Residues, Food Safety, 70–84

BECONI-BARKER, M. G., E. B. SMITH, T. S. ARNOLD, R. E. HORNISH, T. J. VIDMAR und C. GATCHELL (1997):

Metabolism of [¹⁴C] Ceftiofur hydrochloride in swine after intramuscular injections.

J. Agric. Food Chem. 45, 2606–2611

BELL, C., J. R. RHOADES, P. NEAVES und D. SCANNELLA (1995):

An evaluation of the IDEXX SNAP test for the detection of beta-lactam antibiotics in ex-farm raw milks.

Neth. Milk Dairy J. 49, 15–25

BELL, C. und D. SCANNELLA (2007):

An evaluation of the LacTek Beta-Lactam Milk Screening Kit.

Int. J. Dairy Technol. 47, 15–16

BERENDSEN, B. J., M. L. ESSERS, P. P. MULDER, G. D. VAN BRUCHEM, A. LOMMEN, W. M. VAN OVERBEEK, und L. A. STOLKER (2009):

Newly identified degradation products of ceftiofur and cephapirin impact the analytical approach for quantitative analysis of kidney.

J. Chromatogr. A 1216 (46), 8177–86

BERGMANN, A. (1994):

Escherichia-coli-, *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Mastitiden.

in: WENDT, K., H. BOSTEDT, H. MIELKE und H.-W. FUCHS: Euter- und Gesäugekrankheiten.

Verlag Fischer, Jena, Stuttgart, 359–371

BEYER, F. (1986):

Hemmstoffe in der Milch aus technologischer Sicht.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 27, 898–899

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

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

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.

J. Vet. Med. B 42, 377–383

BOISON, J. O. (2001):

Committee on drugs and related topics – drug residues in foods, diagnostics and test kits.

J. AOAC Int. 84, 190–193

BRADY, M. S. und S. E. KATZ (1989):

A microbial assay system for the confirmation of results of receptor assays for antibiotic residues in milk.

J. Food Prot. 52, 198–201

BROWN, S. A., B. J. HANSON, A. MIGNOT, L. MILLERIOUX, P. J. HAMLOW, V. L. HUBBARD, J. K. CALLAHAN und F. M. KAUSCHE (1999):

Comparison of plasma pharmacokinetics and bioavailability of ceftiofur sodium and ceftiofur hydrochloride in pigs after single intramuscular injection.

J. vet. Pharmacol. Therap. 22, 35–40

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

BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (2008/2009):

BVL Jahresbericht 2007 zum Nationalen Rückstandskontrollplan.

[Internet: http://www.bvl.bund.de/DE/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/07_NRKP/01_berichte_nrkp/02_ErgaenzendeDokumente_2007/lm_nrkp_bericht_2007_base_page.html?nn=1622520], letzter Zugriff Juni 2012

CACCIATORE, G. (2005):

Screening auf Rückstände von Beta-Lactam-Antibiotika in Milch: Entwicklung eines optischen Biosensors-Assays mit Penicillin-bindenden Proteinen.

Wuppertal, Univ., Fachber. Math. u. Nat., Diss.

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

CHARM SCIENCE INC., Lawrence (2009):

Produktinformationen zu ROSA SL3 Test, ROSA SL6 Beta-Lactam Test, CHARM SL Beta-Lactam Test, ROSA MRL-3 Beta-Lactam Test (EU), ROSA MRL Beta-Lactam Test und CHARM II Beta-Lactam Tests.

Charm Science Inc., Lawrence, U.S.

[Internet: <http://www.charm.com>], letzter Zugriff Juni 2012

CHIN, N. X., J. W. GU, W. FANG und H. C. NEU (1992):

In vitro activity of cefquinome, a new cephalosporin, compared with other cephalosporin antibiotics.

Diagn. Micr. Infec. Dis. 15, 331–337

CHR. HANSEN GMBH, Nienburg (o.J.):

Hemmstofftests – Microbiological Test Kits.

Chr. Hansen, Nienburg

[Internet: <http://www.chr-hansen.de/produkte.html>], letzter Zugriff Juni 2012

CLINI PHARM (2008):

Wirkstoffdaten: Cefquinom.

Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie, Zürich, Schweiz

[Internet: <http://www.vetpharm.uzh.ch/perldocs/wirksto.htm>], letzter Zugriff Juni 2012

CULLOR, J. S. (1993):

Antibiotic residue tests for mammary gland secretions.

Vet. Clin. Food Anim. 9, 609–620

CUTTING, J. H., W. M. KIESSLING, F. L. BOND, J. E. MCCARRON und K. S. KREUZER (1994):

Agarose gel electrophoretic detection of six β -lactam antibiotic residues in milk.

J. AOAC Int. 78, 663–667

DAP – Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH, Berlin (2007):

Anlage zur Akkreditierungsurkunde DAP-PL-2404.00 – ASU L 01.01.-5, 1996-02 – Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch, Agar-Diffusions-Verfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest).

DAP – Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen, Berlin

[Internet: <http://www.dap.de/anl/PL240400.pdf>], letzter Zugriff Juni 2012

DEGELEAN, J. (1994):

Hemmstoffnachweis in Milch.

Dtsch. Milchwirtsch. 13, 593–596

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

DGA – Deutsche Gesellschaft für Akkreditierung mbH (2009):

Anlage zur Akkreditierungsurkunde DGA-PL-1022.00 – ASU L 01.00-6, 1997-01 – Nachweis von Hemmstoffen in Milch, Agar-Diffusions-Verfahren (Blättchentest).

DGA – Deutsche Gesellschaft für Akkreditierung, Berlin

[Internet: <http://as.dakks.eu/ast/dga/P1102200.pdf>], letzter Zugriff Juni 2012

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

DULLWEBER, A. (2010):

Untersuchungen zum Vorkommen von *Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA)* in Geflügelmastbetrieben.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

EHINGER, A. M., H. SCHMIDT und M. KIETZMANN (2006):

Tissue distribution of cefquinome after intramammary and systemic administration in the isolated perfused bovine udder.

Vet. J. 172, 147–153

EMA (European Medicines Agency) (2012):

Komplette Zusammenfassung der wissenschaftlichen Beurteilung von Tierarzneimitteln, die Cephalosporine der 3. und 4. Generation enthalten – Anhang II.

in: Cephalosporins Art. 35 referral – Annexes I, II and III.

[Internet:http://www.ema.eu/docs/de_DE/document_library/Referrals_document/cephalosporins_35/WC500121720.pdf], letzter Zugriff Juni 2012

EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) – Committee for the Veterinary Medicinal Products (1995):

Cefquinome summary report, EMEA/MRL/005/95.

[Internet: <http://www.ema.europa.eu>], letzter Zugriff Juni 2012

EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) – Committee for Veterinary Medicinal Products (1999):

Ceftiofur summary report (1), EMEA/MRL/498/98-Final July 1999.

[Internet: <http://www.ema.europa.eu>], letzter Zugriff Juni 2012

EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) – Committee for Veterinary Medicinal Products (2003):

Cefquinome summary report (3), EMEA/MRL/883/03.

[Internet: <http://www.ema.europa.eu>], letzter Zugriff Juni 2012

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., R. D. WALKER, C. A. BOLIN, P. C. BARTLETT und D. G. WHITE (2001):

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 (2002):

Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 85, 2571–2575

ESCOBAR, E. N. (o. J.):

Use of antibiotic residue test kits for goat milk.

[Internet: <http://www.luresext.edu/goats/library/field/escobar99b.pdf>], letzter Zugriff Juni 2012

FABRE, J. M. (2006):

Comprendre et prevenir les risque de residus d'antibiotiques dans les denrees d'origine animale.

[Internet: <http://www.dsm.com>], letzter Zugriff August 2009

FOREMAN, J. H. (1998):

Does ceftiofur cause diarrhea?

AAEP Proceedings 44, 146–147

[Internet: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/1998/Foreman.pdf>], letzter Zugriff Juni 2012

FUCHS, H.-W. (1994):

Pathomorphologie der Rindermilchdrüse.

In: WENDT, K., H. BOSTEDT, H. MIELKE und H.-W. FUCHS: Euter- und Gesäugekrankheiten.

Verlag Fischer, Jena, Stuttgart, 246–263

GEDECK, W. (1986):

Problematik der Antibiotika- und Desinfektionsmittelrückstände in der Milch im Zusammenhang mit Mastitistherapie und –prophylaxe.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 27, 894–897

GDCH – Gesellschaft deutscher Chemiker – Arbeitsgruppe pharmakologisch wirksamer Stoffe (2002):

Schnelltestmethoden.

[Internet: <http://www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/schnellm.pdf>], 63–64, letzter Zugriff Juni 2012

GILBERTSON, T. J., R. E. HORNISH, 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, 890–898

GRÄFE, U. (1992):

Biochemie der Antibiotika: Struktur – Biosynthese – Wirkmechanismus.

Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 246–361

HEESCHEN, W. H. und G. SUHREN (1996):

Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk.

Milchwiss. 51, 154–159

HEINRITZI, K. und J. HAGAN (1999):

Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit des neu entwickelten Cephalosporins Cefquinom bei an puerperaler Septikämie und Toxämie erkrankter Sauen.

Tierärztl. Prax. 27, 114–121

HOLSTEGE, D. M., B. PUSCHNER, G. WHITEHEAD und F. D. GALEY (2002):

Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS.

J. Agric. Food Chem. 50, 406–411

HOLTKÖTTER, C., B. KERP, E. SCHNEIDER, E. 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, 2002, Tagungsbericht, 417–421

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

HUTH, S. P., P. S. WARHOLIC, J. M. DEVOU, L. K. CHANEY und G. H. CLARK (2002):

Parallux™ β -lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of Penicillin-G, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Cephapirin and Ceftiofur in bovine milk.

J. AOAC Int. 85, 355–364

IDEXX LABORATORIES, Westbrook, USA (2001):

IDEXX Laboratories Announces U.S. FDA/ CVM approval of Parallux™ milk residue testing system.

IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA

[Internet: http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/corporate/news/press-releases/200110511pr.jsf?SSOTOKEN=0], letzter Zugriff Juni 2012

IDEXX LABORATORIES, Westbrook, USA (2011):

Verschiedene SNAP® Testkits für Antibiotikarückstände sind erhältlich.

IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA

[Internet: http://www.idexx.de/publicweb/de_DE/molkereiprodukte/snap/tests.jsp#bl], letzter Zugriff Juni 2012

IDEXX LABORATORIES, Westbrook, USA (2012):

SNAP Antibiotic Residue Test

IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA

[Internet: http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/dairy/snap.jsf], letzter Zugriff Juni 2012

INTERVET, Unterschleißheim (2005):

Gebrauchsinformation Cobactan[®] DC (Packungsbeilage).

Intervet Deutschland, Unterschleißheim

INTERVET, Unterschleißheim (2007):

Produktinformation: Cobactan[®] 2,5%, Cobactan[®] LC: Ein Wirkstoff – zwei Wege – ein Ziel bei der *E. coli* Mastitis des Rindes.

Intervet Deutschland, Unterschleißheim

INTERVET, Unterschleißheim (2009):

Produktinformationen zu Cobactan[®] LC, Cobactan[®] 2,5% Injektionssuspension, Cobactan[®] 4,5% Injektionslösung und Cobactan[®] LA 7,5%.

Intervet Deutschland, Unterschleißheim

[Internet: <http://www.msd-tiergesundheits.de/species/cattle/produkte.aspx>], letzter Zugriff Juni 2012

JACKMANN, 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 antibiotic treatment.

Food Agric. Immunol. 3, 3–12

JAGLAN, 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

JONES, G. M. und E. H. SEYMOUR (1988):

Cowside antibiotic residue testing.

J. Dairy Sci. 71, 1691–1699

JUNG, C. (1996):

Rückstandskontrolle mit Schnellmethoden.

Dtsch. Milchwirtsch. 12, 543–544

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

KERP, B., E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2003):

Entwicklung und Anwendung immunchemischer Nachweisverfahren für Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch.

in: 44. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 2003, Tagungsbericht, 250–254

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, 2004, Tagungsbericht, 252–257

KIETZMANN, M. (2004):

Einfluss pharmakologisch aktiver Substanzen auf die Lebensmittelsicherheit.

Bundesgesundhb. 9, 834–840

KIETZMANN, M., und W. BÄUMER (2008):

Pharmakodynamische und pharmakokinetische Grundlagen der Mastitistherapie.

J. Verbr. Lebensm. 3, 411–416

KIRST, E. (2008):

Hemmstoffe in der Milch und die Entwicklung der Hemmstoffuntersuchung.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 11, 20–23

KLOTH, K. (2011):

Qualitativer und quantitativer Nachweis von Antibiotika in der milchwirtschaftlichen Praxis.

[Internet: [http://www.qse-gmbh.de/cms/download.php/14/Qualitativer%20und%20quantitativer%20Nachweis%20von%20Antibiotika%20in%20der%20milchwirtschaftlichen%20Praxis%20\(Katrin%20Kloth\).pdf](http://www.qse-gmbh.de/cms/download.php/14/Qualitativer%20und%20quantitativer%20Nachweis%20von%20Antibiotika%20in%20der%20milchwirtschaftlichen%20Praxis%20(Katrin%20Kloth).pdf)], letzter Zugriff Juni 2012

KLUGE, K., und F. R. UNGEMACH (1998):

Neue Arzneimittel für Pferde und landwirtschaftliche Nutztiere und Veränderungen auf dem Arzneimittelmarkt seit 1996.

Tierärztl. Prax. 26 301–306

KNAPPSTEIN, K., G. SUHREN und H.-G. WALTE (2005):

Influence of milking frequencies in automatic milking systems on excretion characteristics of different antibiotics in milk.

Kiel. milchwirtsch. Forschungsber. 57, 215–261

KNIGHT, A. H., N. SHAPTON und G. A. PRENTICE (2007):

Collaborative trial of the Penzym assay: a rapid method for the detection of β -lactam-antibiotics in milk.

Int. J. Dairy Technol. 40, 30–33

KOSHY, K. T. und A. R. CAZERS (1996):

Controlled hydrolysis of ceftiofur sodium, a broad spectrum cephalosporin; isolation and identification of hydrolysis products.

J. Pharm. Sci. 86, 389–395

KRAACK, J. und A. TOLLE (1967):

Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus var. calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.

Milchwiss. 22, 669–673

- KRESS, C., C. SEIDLER, B. KERP, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2007):
Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples.
Anal. Chim. Acta 586, 275–279
- KREUZER, K. (1998):
Schnellmethoden zur Untersuchung der Milch auf Arzneimittelrückstände.
Dtsch. Milchwirtschaft 22, 969–972
- KROKER, R. (2006):
Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen – Cephalosporine.
in: LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.
7. Aufl., Verlag Parey, Berlin, Hamburg
- KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF, E. SCHNEIDER und E. MÄRTLBAUER (1999 a):
Vergleichsuntersuchungen kommerzieller Schnelltests für Betalaktam-Antibiotika in Milch.
in: 40. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 1999, Tagungsbericht, 330–336
- KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF und E. MÄRTLBAUER (1999 b):
Forschungsbericht – Marktübersicht und Leistungsvergleich der aktuell in Bayern erhältlichen Hemmstoff-Schnelltests (Nachweis von Betalaktam-Antibiotika).
Forschungsbericht im Auftrag des Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Aktenzeichen MT1-7606.2-374.
- LESSEL, J. (1996):
Penicillin-bindende Proteine: das Target der β -Lactam-Antibiotika Wirkungsmechanismus von β -Lactamasen und deren Inhibitoren.
Pharm. Uns. Zeit. 25, 17–27

LIMBERT, M., D. ISERT, N. KLESE, A. MARKUS, K. SEEGER, G. SEIBERT und E. SCHRINNER (1990):

Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin.

Antimicrob. Agents Chemother. 35, 14–19

LKV (Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz e.V.), Bad Kreuznach (2008):

Bericht über Arbeiten und Ergebnisse im Prüfungsjahr 2008 – Abgänge von Kühen in ganzjährig geprüften Beständen.

LKV Rheinland-Pfalz e.V., Bad Kreuznach, 36

LVN (Landesvereinigung der Milchwirtschaft Niedersachsen e.V.), Hannover (2008):

Vorsicht beim Einsatz des Antibiotikums „Excenel“ bei Milchkühen.

[Internet: <http://www.milchwirtschaft.de/aktuelles-und-termine/aktuelles/2008/2008-2-vorsicht-beim-einsatz-des-antibiotikums-ampquotexcenelampquot-bei-milchkhen.php>], letzter Zugriff Juni 2012

MACNEIL, J. D. (1996):

Ceftiofur (monohydrochloride and sodium salts).

FAO Food and nutrition paper 41/8

[Internet: <http://www.fao.org/docrep/W8338E/w8338e05.htm>], letzter Zugriff Juni 2012

MÄRTLBAUER, E. (o. J.):

Antibiotikum ohne Wartezeit.

[Internet: <http://www.afema-ev.de/3.1/afema-ev.de/index.php?StoryID=2462>], letzter Zugriff Juni 2012

MÄRTLBAUER, E. (2004):

Immunchemische Methoden.

in: BALTES, W. und L. W. KROH (Hrsg): Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihrer Rohstoffe.

3. Aufl., Behrs Verlag, Hamburg, 289–293

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

MEIER, B. (2008):

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

Gießen, Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

MITCHELL, J. M., M. W. GRIFFITHS, S. A. MCEWEN, W. B. MCNAB und A. J. YEE (1998):

Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance.

J. Food Prot. 61, 742–756

MITCHELL, J. M., A. J. YEE, W. B. MCNAB, M. W. GRIFFITHS und S. A. MCEWEN (1999):

Validation of the LacTek test applied to spiked extracts of tissue samples: determination of performance characteristics.

J. AOAC Int. 82, 79–84

MOATS, W. A. und R. HARIK-KHAN (1995):

Liquid chromatographic determination of β -lactam antibiotics in milk: a multiresidue approach.

J. AOAC Int. 78, 49–54

MOLLENHAUER, M. (1999):

Hemmstoffe-Untersuchungssysteme und rechtliche Hintergründe.

Dtsch. Milchwirtschaft 19, 827–829

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

NAVRATILOVA, P. (2008):

Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review.

Czech J. Food Sci. 26, 393–401

NEAVES, P. (1999):

Monitoring antibiotics in milk – The changing world of test methods.

[Internet: http://www.uni-ulm.de/fileadmin/website_uni_ulm/nugi/Experimente/%C3%96kologie/Antibiotika-Nachweis/Neaves.pdf], letzter Zugriff Juni 2012

NEOGEN EUROPE, Ayr, Schottland (2012):

Dairy Analysis – Penzym[®] Milk Test.

Neogen Europe, Ayr, Schottland

[Internet: http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/Page_Pmilk.pdf], letzter Zugriff Juni 2012

NEWSOME, W. H. (1986):

Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of food.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 919–923

NOUWS, J., H. VANEGMOND, 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

OKERMAN, L., K. DE WASH und J. VAN HOOFF (2003):

Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and in porcine kidneys by solid-phase fluorescence 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., R. T. DUBY, R. W. PRANGE und J. P. TRITSCHLER (1984):

Residue in colostrum following antibiotic dry cow therapy.

J. Dairy Sci. 67, 3081–3084

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

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

PFLEGER, R. und E. ZIEGELWANGER (2000):

Nachweis von Beta-Lactam-Antibiotika in Milchlischgetränken mit dem Delvo-X-Press Test.

[Internet: <http://www.raumberg-gumpenstein.at>], letzter Zugriff Juni 2012

PHARMACIA GMBH, PFIZER, Karlsruhe (2007):

Excenel[®] RTU 50 mg/ml (Gebrauchsinformation).

Pharmacia GmbH, Karlsruhe

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

PITOUT, J. D. D., C. C. SANDERS und W. E. SANDERS (1997):

Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in gram-negative bacilli.

Am. J. Med. 103, 51–59

ROBERT KOCH INSTITUT, Berlin (2007):

ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien.

Epidemiol. Bull. 28, 247–250

ROBERT KOCH INSTITUT, Berlin (2011):

Auftreten und Verbreitung von *MRSA* in Deutschland 2010.

Epidemiol. Bull. 26, 233–241

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, M., P. SCHMID und A. BÖTTNER (1996 a):

Zur Anwendung von Cefquinom beim Rind: Konzentrationsverlauf im Bronchialsekret und in-vitro Wirksamkeit gegenüber *Pasteurella spp.*

Tierärztl. Umschau 51, 760–765

ROSE, B. G., S. A. BUCKLEY, C. KAMPS-HOLTZAPPLE, R. C. BEIER und L. H. STANKER (1996 b):

Ceftiofur Sodium: monoclonal antibody development and cross-reactivity studies with structurally related cephalosporins.

J. Agric. Food Chem. 44, 622–627

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

SALTER, R. S., D. LEGG, N. OSSANNA, C. BOYER, J. SCHEEMAKER, R. MARKOVSKY und S. J. SAUL (2001):

Charm safe-level β -lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephalexin, and penicillin G in raw commingled milk.

J. AOAC Int. 84, 29–36

SCANNELLA, D., P. NEAVES, K. KEEDY und C. BELL (1997):

An evaluation of the Delvo-X-Press β L Test for detecting β -lactams in ex-farm raw milks.

Int. Dairy J. 7, 93–96

SCHÄLLIBAUM, M. (1986):

Problematik der Antibiotika- und Desinfektionsmittelrückstände in der Milch im Zusammenhang mit Mastitistherapie und -prophylaxe.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 24, 784–786

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. CHUH und M. A. NGOH (1998):

Determination of cephalexin and ceftiofur residues in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection.

J. AOAC Int. 81, 973–977

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

SCHNEIDER, E., P. SCHAPPINGER, 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

SHPIGEL, N. Y., D. LEVIN, M. WINKLER, A. SARAN, G. ZIV und A. BÖTTNER (1997):
Efficacy of Cefquinome for treatment of cows with mastitis experimentally induced using
Escherichia coli.

J. Dairy Sci. 80, 318–323

SHPIGEL, N. Y. und P. SCHMID (1997):

Ein Beitrag zur Behandlung der akuten Mastitis des Rindes mit Cefquinom.

Tierärztl. Prax. 25, 200–206

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, 1827–2830

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

STAHLMANN, R. und H. LODE (2001):

Antibiotika und Chemotherapeutika – Antiinfektiöse Therapie.

in: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN und K. STARKE
(Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

8. Auflage, Verlag Urban&Fischer, München, 791–828

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

STRASSER, A., R. DIETRICH, E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (2001):

Immunchemisches Multitestsystem für Antibiotika und Sulfonamide.

in: 42. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 2001, Tagungsbericht, 709–714

STRAUB, R. F., M. LINDER und R. D. VOYKSNER (1994):

Determination of β -Lactam residues in milk using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry.

Anal. Chem. 66, 3651–3658

SUHREN, G. (2002):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch – rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungsverfahren.

Kiel. milchwirtsch. Forschungsber. 54, 35–71

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1987 a):

Detection of antibiotics in milk with a modified microbial receptor assay (Charm test II).

Milchwiss. 42, 493–496

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1987 b):

Entwicklungen zum Antibiotika – Nachweis in Milch.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 48, 1566–1570

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1990):

Zum Nachweis von β -lactam-Antibiotika in Milch mit Cite-Test, Agardiffusionsverfahren und mikrobiellem Rezeptortest.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 24, 785–788

SUHREN G. und W. HEESCHEN (1996):

Detection of inhibitors in milk by microbial tests– a review.

Nahrung 40, 1–7

SUHREN, G., J. REICHMUTH und H. G. WALTE (1996 a):

Detection of β -lactam antibiotics in milk by the Penzym-test.

Milchwiss. 51, 269–273

SUHREN, G., H. G. WALTE und W. HEESCHEN (1996 b):

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, 1996, Tagungsbericht, 315–323.

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998 a):

Screening-Verfahren zum Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch.

in: 39. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 1998, Tagungsbericht, 584–589

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998 b):

Antibiotikarückstände – Neue Tests – neue Aspekte: Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch – Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 14, 674–681

SUHREN, G., R. BEUKERS und J. REICHMUTH (1998):

Beschreibung von Kriterien zur Beurteilung mikrobiologischer Hemmstofftests.

Dtsch. Milchwirtschaft 49, 100–104

SUHREN, G. und K. KNAPPSTEIN (2003):

Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods.

Anal. Chim. Acta 483, 363–372

SUHREN, G. und K. KNAPPSTEIN (2007):

Validation studies with commercially available inhibitor tests for the detection of inhibitors and antibiotic residues in milk.

Kiel. milchwirtsch. Forschungsber. 59, 227–281

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

TEUFEL, P. (2001):

Jahresbericht: Erprobung eines integrierten Nachweissystems für Tierarzneimittelrückstände in Milch an einem Feldmaterial, Ausscheidung von Antibiotika in die Milch in Abhängigkeit von der Melkfrequenz.

BAFM, Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Kiel

THAL, J. (2006):

Entwicklung eines immunochemischen Nachweisverfahrens für Cefquinom.

Gießen, Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

THAL, J., M. STEFFEN, B. MEIER, E. SCHNEIDER, A. ADRIANY und E. USLEBER (2010):

Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow`s milk after therapeutical mastitis treatment.

Anal. Bioanal. Chem. 399, 1051–1059

THEURETZBACHER, U. (1998):

Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren.

Chemotherapie J. 4, 136–142

TYCZKOWSKA, K. L., R. D. VOYKSNER, K. L. ANDERSON und A. L. ARONSON (1993):

Determination of ceftiofur and its metabolite defuroylceftiofur in bovine serum and milk by ion-paired liquid chromatography.

J. Chromatogr. 614, 123–134

USLEBER, E. (1991):

Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Deoxynivalenol und 3-Acetyl-Deoxynivalenol.

München, Univ., Tierärztl. Fak., Diss.

USLEBER, E., E. HENSLER, K. DÖTSCH, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1994 a):
Enzymimmunchemischer Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen in Kuhmilch nach
therapeutischer Applikation.

Arch. Lebensmittelhyg. 45, 80–83

USLEBER, E., E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994 b):
Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in
Lebensmitteln tierischen Ursprungs – eine Übersicht.

Arch. Lebensmittelhyg. 45, 25–48

VAN EENENNAAM, A. L., J. S. CULLOR, L. PERANI, I. A. GARDNER, W. L. SMITH, J.
DELLINGER und W. M. GUTERBOCK (1993):

Our industry today – Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with
naturally occurring clinical mastitis.

J. Dairy Sci. 76, 3041–3053

VETIDATA (2008)

Wirkstoffdaten: Cefquinom.

[Internet: <http://www.vetidata.de>], letzter Zugriff Juni 2012

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 β -Laktam-Antibiotika in Milch mit mikrobiologischen und enzymatischen
Tests.

in: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 1996,
Tagungsbericht, 337–342.

WASHBURN, K., R. JOHNSON, C. R. CLARKE, K. ANDERSON, M. LUCAS, W. BRYSON, J. ROBINSON, K. DAME, V. HUBBARD, K. CALLAHAN und E. ROBB (2005):

Penetration of ceftiofur into sterile vs. *Mannheimia haemolytica*-infected tissue chambers in beef calves after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid sterile suspension in the ear pinna.

J. vet Pharmacol. Therap. 28, 247–251

WINTERER, H. (1985):

Schnellmethode zum Nachweis von β -Lactam-Antibiotika in Milch.

Österr. Milchwissensch. 40, 407–408

WITTE, W. und M. MIELKE (2003):

B-Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum – Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention.

Bundesgesundhb. 10, 881–890

ZAADHOF, K.-J. und E. MÄRTLBAUER (2001):

Vergleich verschiedener Testsysteme auf Hemmstoffe bzw. Tierarzneimittelrückstände.

In: 3. Grundlagenseminar (AFEMA, ADR, INTERLAB) „Aktuelles aus der Praxis der Milchgüteuntersuchung“, Kempten, 2001, Vortrag

ZEHLE, H.-H., P. MÖLLER-HOLTKAMP, H.-P. GARLIPP und H. HÜNNINGER (2004):

Praxisorientierte Erfahrungen mit Cefquinom bei der lokalen und kombinierten Mastitistherapie.

Prakt. Tierarzt 84, 658–665

ZVIRDAUSKIENE, R. und J. SALOMSKIENE (2007):

An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk.

Food Control 18, 541–547

8.1 Zitierte Rechtsvorschriften

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (**Milch-Güteverordnung – MilchGüV**) vom 9. Juli 1980 (BgbI. I, S. 878, 1081), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 17. Dezember 2010 (BgbI. I, S. 2132) geändert worden ist.

Nationaler Rückstandskontrollplan auf der Rechtsgrundlage des Lebens- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BgbI. I, S. 945), Änderung durch Artikel 12 des Gesetzes vom 26. Februar 2008 (BgbI. I, S. 215), zuletzt geändert durch Gesetz zur Änderung des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches vom 29. Juni 2009 (BgbI. I, 1659) und 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 der Entscheidung 89/187/EWG und 91/664/EWG (ABl. 1996, L 125, 10) sowie der Richtlinie 97/747/EG: Entscheidung der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probennahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen (ABl. 1997, L 303, 12).

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).

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (**Lebens- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB**) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BgbI. I, S. 945), Änderung durch Artikel 12 des Gesetzes vom 26. Februar 2008 (BgbI. I, S. 215), zuletzt geändert durch Gesetz zur Änderung des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches vom 29. Juni 2009 (BgbI. I, 1659).

Verordnung (EG) Nr. **470/2009** des europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur

Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/ 90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/ 82/ EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/ 2004 des Europäischen Parlaments und des Rates (ABl 2009, L 152, 11).

Verordnung (EU) Nr. **37/2010** über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs,...gestützt auf die VO (EG) Nr. 470/ 2009...zur Aufhebung der VO (EWG) Nr. 2377/ 90 (ABl. 2010, L 15, 1).

9 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ABl.	Amtsblatt der Europäischen Union
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ADR	Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V.
ad. us. vet.	ad usum veterinarium, für den Veterinärgebrauch
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
BRT-P	Brillantschwarz-Reduktionstest der Firma AiM, mit erhöhter Nachweisempfindlichkeit für Cephalosporine
Bgbl	Bundesgesetzblatt
BSA	Bovines Serumalbumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
[C]	Ceftiofur
CCD-Kamera	Charge-coupled-device-Kamera
CD	Carbodiimid
DCD	Desfuroylceftiofur Cystein Disulphid
DFC	Desfuroylceftiofur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay, Enzymimmunoassay
EMA/ EMA	European Agency for the evaluation of medicinal products, Europäische Arzneimittelbehörde bzw. seit Dezember 2009 European Medicines Agency, Europäische Arzneimittelagentur
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen
et al.	et altera, und andere
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
Fa.	Firma
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
g	Gramm
GDCh	Gesellschaft deutscher Chemiker

GOx	Glucoseoxidase
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IDF	International Dairy Federation
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.mam.	intramammär
k.a.	keine Angaben
kg	Kilogramm
Kan.	Kaninchen
KGW	Körpergewicht
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
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LKV	Landeskontrollverband
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität, München
max	Maximal
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mol	Mol
mmol	Millimol
MilchGüV	Milch-Güteverordnung
min	Minuten
MPR	Milchprüfring
MRL	Maximum Residue Limits, Rückstandshöchstmengen
<i>MRSA</i>	<i>Methicillin-resistente Staphylococcus aureus</i>

n	Anzahl
Na	Natriumsalz
NaCl	Natriumchlorid 0,9%
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
o. J.	ohne Jahrgang
PABA	Paraaminobenzoessäure
PBP	Penicillin-bindende-Proteine
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
Pen G	Penicillin G
RIA	Radioimmunoassay
s.c.	subcutan
SCCmec	<i>staphylococcal</i> cassette chromosome mec
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
syn.	Synonym
TMB	Tetramethylbenzidin
TC	Tetracyclin
TU	Technische Universität
u. a.	und andere
UV	Ultraviolett
VO	Verordnung

Erklärung

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.

Monika Steffen

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

THAL, J., M. STEFFEN, B. MEIER, E. SCHNEIDER, A. ADRIANY und E. USLEBER (2010):

Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow`s milk after therapeutical mastitis treatment.

Anal. Bioanal. Chem. 399, 1051–1059

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung und Ansprechbarkeit, die verständnisvolle Geduld und tatkräftige Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Der Firma AiM – Analytik in Milch GmbH, München, insbesondere Herrn Dr. A. Adriany, möchte ich herzlich für die Bereitstellung des BRT-P-Testsystems und die freundliche Hilfe und gute Zusammenarbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Joachim Wittkowsky vom Landeskontrollverband Rheinland-Pfalz für die freundliche Auskunft und Unterstützung bedanken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen/-innen Yvonne Ackermann, Dr. V. Curtui, Dr. Madeleine Groß, Christa Zeidler, Margit Kessler und Renate Stumpf, und allen anderen Mitarbeitern des Institutes, die mir tatkräftig zur Seite gestanden haben und immer eine helfende Hand übrig hatten. Vielen Dank für die schöne Zeit mit Euch.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben und mich auf meinem bisherigen Lebensweg uneingeschränkt begleitet, unterstützt und bestärkt haben. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Schwiegereltern, meine Freunde und den Rest meiner Familie, auf die ich mich immer verlassen kann.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Thomas und meinen wundervollen Kindern bedanken, deren Unterstützung, Rückhalt, Liebe und Geduld das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Ihr bereichert mein Leben jeden Tag aufs Neue. Ich danke euch für alles.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5907-1



9 783835 11959071