

Untersuchungen zur Anwendbarkeit eines integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch

Claudia Kress



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 2010

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 2010

© 2010 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
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Untersuchungen zur Anwendbarkeit eines integrierten Nachweissystems
für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch**

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

eingereicht von

Claudia Kress

Tierärztin aus Unna

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Petzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2010

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Tierarzneimittel-Rückstände in der Milch	3
2.1.1	Allgemeines zu Tierarzneimittel-Rückständen in der Milch	3
2.1.2	Ursachen von Tierarzneimittel-Rückständen in der Milch	4
2.1.3	Gesundheitliche und technologische Risiken	6
2.1.4	Rechtliche Grundlagen	8
2.2	Penicilline	12
2.2.1	Allgemeines	12
2.2.2	Struktur und Charakteristika	12
2.2.3	Wirkungsprinzip	15
2.3	Nachweisverfahren für Penicillin-Rückstände in Milch	15
2.3.1	Mikrobiologische Hemmstofftests	15
2.3.1.1	Allgemeines zu mikrobiologischen Hemmstofftests	15
2.3.1.2	Amtliche Untersuchungsmethodik	17
2.3.1.3	Kommerzielle Hemmstofftestsysteme	18
2.3.1.3.1	Brillantschwarz-Reduktionstest	18
2.3.1.4	Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch mittels mikrobiologischer Testsysteme	20
2.3.2	Immunologische Verfahren und Schnelltestsysteme	21
2.3.2.1	Enzymimmuntests	22
2.3.2.2	Schnelltests zum Nachweis von β -Laktam-Antibiotika	26
2.3.2.2.1	β s.t.a.r	26
2.3.2.2.2	SNAP-Beta-Laktam Test	27
2.3.2.3	Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch mittels immunologischer Verfahren und mit Schnelltestsystemen	28
2.3.3	Physikalisch-chemische Verfahren	31
2.3.4	Integriertes Nachweissystem für Tierarzneimittel-Rückstände in Milch	32

3	MATERIAL UND METHODEN	34
3.1	Materialien und Geräte	34
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	34
3.1.2	Antibiotika und Penicillinase	34
3.1.3	Puffer und Lösungen	35
3.1.4	Immunreagenzien	36
3.1.5	Probenmaterial	39
3.1.5.1	Kuhmilch	39
3.1.5.2	Ziegenmilch	39
3.1.6	Kommerzielle Hemmstofftestsysteme	41
3.1.7	Geräte	41
3.1.8	Sonstige Materialien	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Etablierung und Durchführung der Nachweisverfahren	42
3.2.1.1	Enzymimmunologische Nachweise	42
3.2.1.1.1	Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen	42
3.2.1.1.1.1	Herstellung und Überprüfung des Ampicillin-Enzym-Konjugates	42
3.2.1.1.1.2	Durchführung des Enzymimmuntests	44
3.2.1.1.1.3	Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems	45
3.2.1.1.1.4	Überprüfung der Spezifität des Testsystems	45
3.2.1.1.2	Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)	46
3.2.1.1.2.1	Testdurchführung und Auswertung	46
3.2.1.1.2.2	Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems	46
3.2.1.1.3	Enzymimmuntest zum Nachweis von Isoxazolympenicillinen (Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin)	47
3.2.1.1.3.1	Testdurchführung und Auswertung	47
3.2.1.1.4	Enzymimmuntest zum Nachweis von Streptomycin	47
3.2.1.1.4.1	Testdurchführung und Auswertung	48
3.2.1.1.5	Enzymimmuntest zum Nachweis von Tetracyclin	48
3.2.1.1.5.1	Testdurchführung und Auswertung	48
3.2.1.1.6	Enzymimmuntest zum Nachweis von Ampicillin	49
3.2.1.1.6.1	Testdurchführung und Auswertung	49

3.2.1.2	Mikrobiologische Hemmstofftests und Rezeptorschnelltests	50
3.2.1.2.1	Testdurchführung und Auswertung des mikrobiologischen Testsystems	50
3.2.1.2.2	Testdurchführung und Auswertung der Rezeptorschnelltests	51
3.2.2	Untersuchung der Kuhmilchproben mittels integriertem Nachweissystem	52
3.2.2.1	Probenvorbereitung und künstliche Kontaminierung	52
3.2.2.2	Durchführung der Untersuchungen von Kuhmilch auf Penicillin-Rückstände	56
3.2.3	Untersuchung der Ziegenmilchproben	60
3.2.3.1	Modifikation und Etablierung der enzymimmunchemischen Testsysteme	60
3.2.3.1.1	Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen	60
3.2.3.1.1.1	Optimierung der Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch	60
3.2.3.1.1.2	Durchführung des gruppenspezifischen Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillinen	61
3.2.3.1.1.3	Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems	61
3.2.3.1.2	Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)	61
3.2.3.1.2.1	Optimierung der Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch	61
3.2.3.1.2.2	Durchführung des Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)	62
3.2.3.2	Probengewinnung und –aufbereitung	62
3.2.3.3	Durchführung der Untersuchungen	62
4	ERGEBNISSE	64
4.1	Etablierung der Nachweisverfahren	64
4.1.1	Enzymimmunologische Nachweise	64
4.1.1.1	Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin	64
4.1.1.1.1	Überprüfung des Ampicillin-Enzym-Konjugates	64
4.1.1.1.2	Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems	64
4.1.1.1.3	Spezifität des Testsystems	66

4.1.1.2	Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)	66
4.1.1.2.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems	66
4.2	Nachweis von Penicillin-Rückständen in Kuhmilch mittels integriertem Nachweissystem	68
4.2.1	Nachweis von Penicillin-Rückständen in künstlich kontaminierter Kuhmilch	68
4.2.2	Nachweis von Penicillin-Rückständen in hemmstoffpositiver Kuhmilch	69
4.3	Nachweis von Penicillin-Rückständen in Ziegenmilch	72
4.3.1	Modifikation und Etablierung der enzymimmunchemischen Testsysteme	72
4.3.1.1	Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen	72
4.3.1.1.1	Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch	72
4.3.1.1.2	Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems	73
4.3.1.2	Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)	74
4.3.1.2.1	Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch	74
4.3.2	Ergebnisse der Untersuchung von Ziegenmilch auf Penicillin-Rückstände	74
5	DISKUSSION	76
5.1	Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin	78
5.2	Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)	79
5.3	Nachweis von Penicillin-Rückständen in Kuhmilch mittels integriertem Nachweissystem	80
5.3.1	Nachweis von Penicillin-Rückständen in künstlich kontaminierter Kuhmilch	80
5.3.2	Nachweis von Penicillin-Rückständen in hemmstoffpositiver Kuhmilch	81

5.4	Nachweis von Penicillin-Rückständen in Ziegenmilch	83
5.4.1	Modifikation und Etablierung der enzymimmunchemischen Testsysteme	83
5.4.2	Ergebnisse der Untersuchung von Ziegenmilch auf Penicillin-Rückstände	84
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
7	SUMMARY	88
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	112
10	DANKSAGUNG	113

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AMG	Arzneimittelgesetz
BDE	Bunte Deutsche Edelziege
BPO	Benzylpenicilloylsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
CCRVDF	Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food
DASP	Double Antibody Solid Phase, Doppelantikörpertechnik
DC	Dünnschichtchromatographie
DFC	Desfuoylceftiofur
DMSO	Dimethylsulfoxid
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSA	Humanes Serumalbumin
HVL	Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e. V.
IDF	International Dairy Federation
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
konv.	konventionell
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LKV	Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung
Max	Maximalwert
Med	Median
Min	Minimalwert
MLP	Milchleistungsprüfung
MRL	Maximum Residue Limits

MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NWG	Nachweisgrenze
ökol.	ökologisch
OVA	Ovalbumin
PABA	p-Aminobenzoessäure
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
Penase	Penicillinase
Pen G	Penicillin G
RIA	Radio Immunassay
RT	Raumtemperatur
SAA	Schweizer Saanenziege
TÄHAV	tierärztlichen Hausapothekenverordnung
THW	Thüringer Waldziege
TOG	Toggenburger Ziege
VO	Verordnung
WDE	Weißer Deutsche Edelziege
6-APS	6-Aminopenicillan-Säure

1 EINLEITUNG

β -Laktam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) gehören in der Tiermedizin zu den am häufigsten eingesetzten Arzneimitteln. Vor allem in der Therapie der subklinischen Mastitis sowie als Trockensteller werden beim Rind nach wie vor überwiegend Penicilline eingesetzt. Auch bei den zur Milchgewinnung eingesetzten kleinen Wiederkäuern (Schaf, Ziege) kommen Penicilline bei Mastitiden häufig zum Einsatz (BUSWELL et al. 1989; DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al. 1998).

Durch den breiten veterinärmedizinischen Einsatz dieser Antibiotika ist in Lebensmitteln tierischen Ursprungs die Gefahr einer Rückstandsbildung gegeben. Dabei besteht die gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers in erster Linie in der Auslösung von Allergien und in der Gefahr der Resistenzbildung humanpathogener Erreger (BECKER 1976; DEWDNEY und EDWARDS 1984). Große wirtschaftliche Verluste können bereits kleinste Spuren von Hemmstoffen verursachen, die die Säuerungs- und Reifungsvorgänge bei der Verarbeitung von Milch zu Sauermilchprodukten, Butter, Joghurt und Käse stören (BEYER, 1986; HERRE, 1992).

Zum Schutz des Verbrauchers und zur Vermeidung technologischer Störungen wurden daher EU-weit Rückstandshöchstmengen (maximum residue limits = MRLs) für die zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Stoffe in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs festgelegt. Obwohl seit Einführung der ersten Rückstandshöchstmengen nach EU-Verordnung 2377/90 schon zwanzig Jahre vergangen sind, und obwohl zahlreiche biochemische und physikalisch-chemische Methoden beschrieben wurden, existieren *de facto* immer noch keine routinetauglichen Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von β -Laktam-Antibiotika in Lebensmitteln, die mit vertretbarem Kostenaufwand ein schnelles Ergebnis liefern. Die verschiedenen kommerziell erhältlichen Schnelltestsysteme zum Nachweis von β -Laktam-Antibiotika sind zwar hinsichtlich ihrer Testsensitivität meist ausreichend, lassen aber prinzipiell keine Identifizierung und Quantifizierung der vorhandenen Wirkstoffe zu (KROLL, 2000). Physikalisch-chemische Nachweisverfahren wurden zwar beschrieben (BYGRAVE et al., 1995; KANTIANI et al., 2009), sind wegen des hohen apparativen, personellen und zeitlichen Aufwandes für den Routineeinsatz nach wie vor nicht geeignet. Enzymimmunologische Verfahren stellen eine etablierte Technik mit hoher Sensitivität bei schneller und einfacher Durchführung dar. Die Immuntests bieten die

Möglichkeit zur Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände und sind hinsichtlich des apparativen Aufwandes kostengünstig durchführbar (USLEBER et al., 1994; SPINKS, 2000). Daher wurde ein integriertes Nachweissystem entwickelt, das eine große Anzahl verschiedener Antiinfektiva in Milch detektieren kann bzw. durch Anwendung und Kombination verschiedener Methoden (mikrobiologische Tests, Rezeptor-Bindungstests, Enzymimmuntests) eine bestmögliche und vor allem effiziente Erfassung vieler Substanzen gewährleisten soll (USLEBER et al., 2000; HOLTKÖTTER et al., 2002; SUHREN 2002a; KERP et al., 2004; KRESS et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die Anwendbarkeit des integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch zu überprüfen, zum anderen sollte anhand der Ergebnisse ein Überblick über die Hemmstoffbelastung von Ziegenmilch geschaffen werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Tierarzneimittel-Rückstände in der Milch

2.1.1 Allgemeines zu Tierarzneimittel-Rückständen in der Milch

Traditionell werden in der Milchwirtschaft alle Agenzien, die zu einer Aktivitätsreduktion oder Wachstumsinhibition der zu verschiedenen Zwecken eingesetzten bakteriellen Kulturen führen, summarisch als „Hemmstoffe“ bezeichnet. Die größte Bedeutung unter den Hemmstoffen in der Milch kommt dabei seit Jahrzehnten den Tierarzneimittelrückständen zu, insbesondere den Antiinfektiva (Antibiotika, Sulfonamide). Die intramammäre Verabreichung von Antibiotika stellt hierbei insgesamt das größte Risiko der Rückstandsbildung in der Milch dar, Anwendungsfehler (Überdosierung, Applikationsart) und Nichteinhaltung der Wartezeiten kommen sind häufige Hemmstoffursachen. Penicilline, die häufig in der Therapie der subklinischen Mastitis der Kuh eingesetzt werden, spielen hier nach wie vor die Hauptrolle, in den letzten Jahren werden zunehmend auch Cephalosporine als Hemmstoffursache ermittelt. Auch in anderen Ländern, wie den USA oder Schweden, ist Penicillin G das von Tierärzten meist eingesetzte Antibiotikum bei Milchkühen und somit auch der am häufigsten nachgewiesene Hemmstoff in Milch (SUNDLOF 1995; STERNESJÖ und JOHNSON 2003; PAYNE et al. 2006; KRESS et al., 2007).

Im Hinblick auf den Einsatz von antimikrobiell wirksamen Substanzen ist auch bei Milchziegen die Mastitis die wichtigste Infektionskrankheit. Penicilline kommen entsprechend auch bei Schaf und Ziege häufig zum Einsatz (BUSWELL et al. 1989; DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al.1998).

Die Ergebnisse von Untersuchungen auf Hemmstoffe in Kuhmilch zeigten, dass in der Mehrzahl der Fälle Penicilline die Ursache der Beanstandung darstellten. So waren es beispielsweise in der Schweiz bei 4469 hemmstoffpositiven Milchproben der Jahre 1986 bis 1995 99,3 %. In Bayern werden jährlich etwa 93-95 % der positiven Proben nichtpenicillinasefesten β -Laktam-Antibiotika zugeordnet (BAUMGARTNER 2002). Bei Untersuchungen von Milch auf der Tankwagenebene in Norddeutschland wurden bei 66,8 % aller positiven Befunde β -Laktam-Antibiotika als Wirkstoffgruppe identifiziert (SUHREN et al., 1996). Auch für Anlieferungs- und Konsummilch aus Bayern wurde festgestellt, dass Antiinfektiva ausserhalb der Gruppe der betalactam-Antibiotika als Rückstandsbildner in Milch offensichtlich keine wichtige Rolle spielen (LOCHBIHLER et al., 1995).

Insgesamt ist die Belastungshäufigkeit der Kuhmilch mit Hemmstoffen relativ gering, zumindest auf Anlieferungsmilchebene. Während in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts bei der ersten größeren Untersuchung (6716 Betriebe) noch 2,4% positive Befunde ermittelt wurden (KRAACK und TOLLE, 1969), ging der Anteil hemmstoffpositiver Proben in der Folge, vor allem aufgrund intensiver Kontroll- und Sanktionsmaßnahmen, auf ein relativ niedriges Niveau zurück. Hierzu liegen umfangreiche Daten aus einem langen Zeitraum vor, erhoben im Rahmen der Milchgüteprüfung. So zeigte das Auftreten von hemmstoffpositiven Befunden zwischen den Jahren 1977/79 und 2000 eine Abnahme von 0,5 % auf 0,08 % (SUHREN und REICHMUTH 2002). Der Hessische Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e. V. (HVL) verzeichnete im Prüfungsjahr 2003/2004 0,08 % hemmstoffpositive Proben im Vergleich zu 0,11 % im Prüfungsjahr 2002/2003 und 0,12 % in 2001/2002, diese Werte sind seit Jahren relativ stabil (HVL 2002, 2003, 2004, 2009). Ähnliche Häufigkeiten werden in den Mitteilungen des Milchprüfungs Bayern veröffentlicht, wobei die hier erhobenen Daten fast 50% der deutschen Milchwirtschaft repräsentieren (<http://www.mpr-bayern.de>). So wurden beispielsweise im Jahre 2009 in Anlieferungsmilch bei einer Gesamtprobenzahl von fast einer halben Million in 825 Proben (0,17%) Hemmstoffe nachgewiesen (<http://www.mpr-bayern.de/3.1/mpr.de/data/media/3218/MPR-JAusw-2009-Hemm-Abz.pdf>).

Zahlen zum Vorkommen von Antibiotika-Rückständen in Ziegenmilch liegen dagegen so gut wie keine vor, wohl auch weil Ziegenmilch nicht der Milchgüteprüfung nach Milchgüteverordnung im engeren Sinne unterliegt. Im Rahmen einer Untersuchung des Eutergesundheitsstatus einer Ziegenherde mit 45 Milchziegen erwiesen sich die Tankmilchproben über eine Laktation als Hemmstoff-negativ (KNAPPSTEIN et al. 2003). Auch in etwas älteren Studien zeigten sich beispielsweise 183 Einzel- und Gesamtgemelksproben (HAHN und KNORR 1989) und 229 Ziegenmilchproben (197 Häftengemelke und 32 Sammelmilchproben) frei von Arzneimittelrückständen (OELFKEN 1993).

2.1.2 Ursachen von Tierarzneimittel-Rückständen in der Milch

Die möglichen Ursachen einer Kontamination der Milch mit Tierarzneimitteln werden in drei Bereiche eingeteilt. Erstens kann der Grund für die Kontamination die Zusammensetzung

(Wirkstoff, Galenik) des zur Behandlung eingesetzten Präparates oder sein Ausscheidungsverhalten mit der Milch (Pharmakokinetik) sein. Zweitens kommt das behandelte Tier selbst, z. B. eine verzögerte Ausscheidung infolge pathologischer Euterveränderungen, in Frage. Drittens, und dies mit größter Wahrscheinlichkeit, können die Ursachen von Tierarzneimittel-Rückständen in der Milch auf Fehler im Umgang mit bzw. bei der Anwendung von Antibiotikapräparaten liegen. Hier sind zum Beispiel Fehler bei der Kennzeichnung behandelter Tiere oder bei der Melkreihenfolge (behandelte Tiere zuletzt und in separaten Eimer melken) zu nennen. Da die Kontrolldichte und damit die Erkennungsrate hemmstoffpositiver Proben sehr hoch ist, was den Milcherzeugern auch hinlänglich bekannt ist, dürften nur vergleichsweise selten Antibiotikarückstände aufgrund absichtlicher Handlungsweisen in die Anlieferungsmilch gelangen, wie dies bereits von verschiedenen Autoren ausgeführt wurde (SCHÄLLIBAUM 1986; BAUMGARTNER 2002).

Bezüglich der Art und Weise, wie Tierarzneimittel-Rückstände in die Milch gelangen, können die sekretorische und die postsekretorische Kontamination unterschieden werden. In mehr als 50% der Fälle erfolgt die Kontamination der Tankmilch nach dem Melken. Hier dominiert als Ursache das Nichtbeachten der Melkreihenfolge, gefolgt von ungenügender Reinigung der Melkmaschine und des Milchgeschirrs nach dem Melken. Bei der sekretorischen Kontamination sind die meisten Fälle auf Nichteinhaltung der vorgeschriebenen Wartezeit zurückzuführen. Außerdem kommen das versehentliche Anmelken einer frisch mit antibiotischem Euterschutz trockengestellten Kuh in Frage und die Antibiotikaausscheidung nach vorzeitigem Abkalben, ebenfalls im Zusammenhang mit einer zu kurzen Trockenzeit nach Anwendung von antibiotischen Euterschutzpräparaten (BAUMGARTNER 2002; MILCHPRÜFRING BAYERN e. V. 2000–2003).

Der weitaus größte Teil (88–95%) der Kontaminationen von Milch mit Tierarzneimittel-Rückständen ist auf intramammäre Applikation zur Mastitistherapie und zum Trockenstellen zurückzuführen. Andere Therapieformen, wie die parenterale, intrauterine und äußerliche Anwendung, werden wesentlich seltener als Rückstandsursache identifiziert (ALLISON 1985; FABRE et al. 1995; BAUMGARTNER 2002). Eine orale Verabreichung von Penicillinen ist dagegen zumindest bei der Milchkuh nicht sinnvoll und damit im Hinblick auf Rückstände in der Milch vernachlässigbar (WRIGHT und HAROLD 1960).

2.1.3 Gesundheitliche und technologische Risiken

Die gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers durch Rückstände von Tierarzneimitteln besteht in erster Linie in der Auslösung von Allergien und in der Gefahr der Resistenzbildung humanpathogener Erreger. Insbesondere Penicilline können bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen verschiedener Schweregrade hervorrufen, die von lokalen Hautreaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock reichen. Die Wahrscheinlichkeit, über den Konsum von Milch eine hohe Dosis an Penicillin aufzunehmen ist zwar recht gering, da die Kontrollen im Rahmen der Milchgüteprüfung seit langem eine recht effiziente Maßnahme darstellen. Dennoch ist eine allergische Reaktion nach Verzehr penicillinhaltiger Lebensmittel prinzipiell möglich (BECKER 1976; DEWDNEY und EDWARDS 1984). Es existieren allerdings keine Erkenntnisse über eine möglichen de-novo-Sensibilisierung durch Penicillin-Rückstände in Milch. Eine umfassende Literaturstudie aus dem Jahr 1991 berichtet von weniger als zehn Fällen von allergischen Reaktionen zuvor sensibilisierter Personen nach oraler Aufnahme von Penicillin in Milch in den davor liegenden 25 Jahren (DEWDNEY et al. 1991). Im Bezug auf Allergien wird daher das Risiko einer akuten gesundheitlichen Schädigung des Konsumenten durch Antibiotika-Rückstände in der Milch als äußerst gering eingestuft (TERPLAN und ZAADHOF, 1975).

Besondere Aufmerksamkeit wird außerdem der Entstehung bakterieller Resistenzen der Darmkeime sowie der Übertragung resistenter Keime vom Tier auf den Menschen entgegengebracht (TERPLAN und ZAADHOF, 1975; MITCHELL und YEE, 1995). Die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen über Lebensmittel kann im Wesentlichen auf drei verschiedenen Wegen erfolgen: Durch Aufnahme von Rückständen antibiotisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln, durch resistente Infektions- und Intoxikationserreger in Lebensmitteln, und durch resistente Spezies innerhalb der lebensmitteleigenen, originären Mikroflora (KLEIN 1999). In *in vitro* Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* wurde gezeigt, dass bei Antibiotika-Konzentrationen, die laut FDA-Vorschlägen als „safe-levels“ angesehen werden, also durchaus in Lebensmitteln vorkommen können, Resistenzentwicklungen möglich sind (BRADY et al. 1993). So betonen HONKANEN-BUZALSKI und SUHREN (1999) im Bezug auf den gesundheitlichen Verbraucherschutz die Wichtigkeit des ausschließlichen Einsatzes von für die betreffende Tierart zugelassenen Medikamenten, die korrekte Dosierung und die Einhaltung der Wartezeiten zur Reduzierung des Risikos von Resistenzbildung. Das Risiko nimmt zu, wenn – wie in den USA – beinahe

90% aller Antibiotika, die im Nutztier- und Geflügelsektor eingesetzt werden, in subtherapeutischen Dosen zur Infektionsprophylaxe oder als Wachstumsförderer zum Einsatz kommen (TOLLEFSON und MILLER 2000). Sofern die Anwendung der Antibiotika aber den „Leitlinien für den sorgsamem Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln“ entspricht, werden kaum Gefahren hinsichtlich einer Resistenzentwicklung bei den zu bekämpfenden Infektionserregern gesehen (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001).

Antibiotikarückstände in Anlieferungsmilch können große wirtschaftliche Verluste verursachen, da sie die Säuerungs- und Reifungsvorgänge bei der Verarbeitung von Milch zu Sauermilchprodukten, Butter, Joghurt und Käse stören oder sogar verhindern (BEYER, 1986; HERRE, 1992). Da insgesamt mehr als 80% der Milchmenge einer Verarbeitung unter Einsatz von bakteriellen Kulturen unterzogen wird, ist dieses Problem in der Milchwirtschaft weitaus bedeutsamer als für andere Lebensmittel. Die Hemmstoffproblematik in Milch ist daher praktisch so alt wie die Anwendung der Antibiotika selbst. TERPLAN und ZAADHOF (1967) datieren den ersten Hinweis auf Schäden in der Verarbeitung auf 1947. Die Folgen der Hemmung von Säuerungs- und Reifungskulturen sind längere Produktionszeiten sowie Qualitätsminderungen bis hin zur Fehlproduktion. Im Käse können Fehler wie Molkenlässigkeit, Bitterpeptidbildung, fehlende oder falsche Lochbildung und beeinträchtigte oder falsche Schimmelbildung auftreten (KIRST, 1999). Eine Übersicht über den Einfluss verschiedener Antibiotika auf technologisch wichtige Starterkulturen findet sich bei SUHREN (1996).

Die genannten Risiken von Antibiotikarückständen gelten selbstverständlich auch für Milch kleiner Wiederkäuer. Hier sind allerdings nur sehr wenige Literaturangaben verfügbar, auch hier wird der sorgsamem Umgang mit antimikrobiell wirksamen Substanzen angemahnt (HAENLEIN 1993; BERGONIER et al. 2003). Grundsätzlich liegen die Verzehrsmengen an Ziegen- und Schafmilch deutlich niedriger als bei Kuhmilch, so dass die Expositionshäufigkeit geringer ist. In noch größerem Umfang als Kuhmilch wird Ziegen- und Schafmilch zu Käse verarbeitet, so dass die technologischen Risiken einer Kontamination mit Antinfektiva hier ebenfalls erheblich sind.

2.1.4 Rechtliche Grundlagen

Nach § 10, Abs. 1 des **Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuchs** (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) ist es verboten vom Tier gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die bei den zur Nahrungsmittelerzeugung genutzten Tieren nicht angewendet werden dürfen oder bestimmte festgesetzte Höchstmengen überschreiten. Weiterhin regelt § 10, Abs. 3, dass von einem Tier, dem Stoffe mit pharmakologischer Wirkung, die als Arzneimittel zugelassen oder registriert sind, zugeführt worden sind, gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig nur in den Verkehr gebracht werden dürfen, wenn die festgesetzten Wartezeiten eingehalten worden sind.

Die genaue Festsetzung der in § 10 LFGB erwähnten Höchstmengen (Maximum Residue Limits = MRL) wurde vor 20 Jahren mit der 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 erstmals realisiert. Mittlerweile ist VO 2377/90 zwar durch Verordnung (EG) **Nr. 470/2009** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 ersetzt worden, die Rückstandshöchstmengen wurden jedoch sachlich unverändert in diese neue Rechtsvorschrift übernommen. Ursprünglich existierten nach VO 2377/90 vier verschiedene Kategorisierungen der Wirkstoffe. Kürzlich wurde mit **Verordnung 37/2010** der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs eine vereinfachte Gruppierung der relevanten pharmakologisch wirksamen Substanzen in **zulässige Stoffe** (Tabelle 1) und **verbotene Stoffe** (Tabelle 2) eingeführt. β -Lactam-Antibiotika finden sich somit in Tabelle 1 dieser Verordnung wieder. In Tabelle 2.1 sind die derzeit gültigen Höchstmengen für Penicilline in Milch nach VO 37/2010 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Höchstmengen (MRLs) für Penicilline in Milch nach Verordnung (EU) Nr. 37/2010, Tabelle 1

Pharmakologisch wirksamer Stoff	Marker-Rückstand	MRL (µg/kg)	Sonstige Vorschriften
Benzylpenicillin	Benzylpenicillin	4	
Ampicillin	Ampicillin	4	
Amoxicillin	Amoxicillin	4	
Cloxacillin	Cloxacillin	30	
Dicloxacillin	Dicloxacillin	30	
Nafcillin	Nafcillin	30	Nur zur intramammären Anwendung
Oxacillin	Oxacillin	30	
Penethamat	Benzylpenicillin	4	

Auch das zurzeit gültige **Arzneimittelgesetz (AMG)** befasst sich im § 58 mit Arzneimitteln für lebensmittelliefernde Tiere. Tierhalter, also auch Milcherzeuger, sind zur ordnungsgemäßen Anwendung von Tierarzneimitteln verpflichtet. Diese dürfen nur nach einer tierärztlichen Behandlungsanweisung für den betreffenden Fall eingesetzt werden. Weiterhin regelt § 56a die Anwendung bzw. Abgabe von Arzneimitteln, die ausschließlich für die behandelte Tierart zugelassen sind. Hier ist, wie auch in der **tierärztlichen Hausapothekenverordnung (TÄHAV)** §12a, festgehalten, dass der Tierarzt die Wartezeit anzugeben hat. Die Halter von Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, müssen ein Bestandsbuch führen, in dem die Anwendung von Arzneimitteln dokumentiert wird, die Tierärzte sind zum Ausfüllen eines Arzneimittel-Anwendungs- und Abgabebelegs mit der Angabe der einzuhaltenden Wartezeit verpflichtet.

Im **EU-Lebensmittel Hygienerecht**, in der **Verordnung (EG) Nr. 853/2004** des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004, Anhang III, Abschnitt IX, Kapitel I wird unter den „Hygienevorschriften für die Rohmilcherzeugung“ ebenfalls festgelegt, dass Rohmilch von Tieren stammen muss, denen keine nicht zugelassenen Stoffe oder Erzeugnisse verabreicht worden sind. Außerdem wird auch hier wiederum auf die Einhaltung der vorgeschriebenen Wartezeit hingewiesen.

In den „Hygienevorschriften für Milcherzeugerbetriebe“ wird diesen im Sinne von Eigenkontrollen vorgeschrieben, dass gewährleistet sein muss, dass Tiere, die infolge einer tierärztlichen Behandlung Rückstände in die Milch übertragen können, identifiziert werden

und dass Milch, die vor Ablauf der vorgeschriebenen Wartezeit gewonnen worden ist, nicht für den menschlichen Verzehr verwendet wird.

Weiterhin müssen die Lebensmittelunternehmer laut der „Kriterien für Rohmilch“ sicherstellen, dass diese nicht in Verkehr gebracht wird, wenn ihr Gehalt an Rückständen von Antibiotika über den zugelassenen Mengen für einen der Stoffe der Tabelle 1 der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 liegt oder die Gesamtrückstandsmenge aller antibiotischen Stoffe den höchstzulässigen Wert überschreitet. Diese Maßnahmen erfolgen unbeschadet der Richtlinie 96/23/EG und ersetzen die zuvor in der Milch-Verordnung festgelegten Bestimmungen über Eigenkontrollen der Be- und Verarbeitungsbetriebe. Die zuständige Behörde überwacht laut der **Verordnung (EG) Nr. 854/2004** des europäischen Rates vom 29. April 2004 diese Kontrollen.

Nach der zuvor erwähnten **Richtlinie 96/23/EG** des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen wird für jedes EU-Land ein Rückstandskontrollplan zur Überwachung tierischer Erzeugnisse auf Rückstände von gesundheitlich unerwünschten Stoffen bereits von Beginn des Produktionsprozesses an vorgeschrieben. Dieser nationale Rückstandskontrollplan wird jährlich neu erstellt und enthält konkrete Vorgaben über die Anzahl der zu untersuchenden Tiere oder tierischen Erzeugnisse, die zu untersuchenden Stoffe, die anzuwendende Methodik und die Probennahme. Ziel des nationalen Rückstandskontrollplans ist es, die illegale Anwendung verbotener Substanzen bzw. die missbräuchliche Verwendung von beschränkt zugelassenen Substanzen aufzudecken, die Einhaltung der festgelegten Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände zu überprüfen sowie die Ursachen der Rückstandsbelastungen aufzuklären.

Die **Milchgüte-Verordnung** legt die Güteprüfung und die Bezahlung der Anlieferungsmilch fest. Danach wird Anlieferungsmilch monatlich mindestens zwei Mal u. a. auf die Anwesenheit von Hemmstoffen überprüft, wobei eine Identifizierung des den Befund auslösenden Agens nicht vorgeschrieben ist. Die Untersuchung muss nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren §64 LFGB Nummer L 01.01-05 durchgeführt werden. Sind Hemmstoffe vorhanden, beträgt der Abzug des Auszahlungspreises je positives Ergebnis 5 ct/kg für den Anlieferungsmonat, ausserdem kann der Zuschlag für Güteklasse S nicht gewährt werden. Als Anlieferungsmilch im Sinne dieser

Verordnung ist allerdings nur die Milch von Kühen definiert. Auf Betriebe, die Milch von Schafen und/oder Ziegen gewinnen, ist die Milch-Güte-VO nicht anwendbar, obwohl in Milchlieferverträgen mit Molkereien durchaus analoge Vereinbarungen getroffen werden können. Dies betrifft allerdings nur größere Erzeuger bei denen eine Verwertung der Milch in einer Molkerei erfolgt; die Milch kleinerer, direktvermarktender Betriebe wird in der Regel nicht auf Hemmstoffe kontrolliert.

Das Vorkommen bzw. der Nachweis von Hemmstoffen und Tierarzneimittelrückständen in Milch wird also mit unterschiedlichen Zielsetzungen beurteilt: Während der Nachweis antibiotisch wirksamer Rückstände unter dem Hemmstoffbegriff nach der Milch-Güte-Verordnung mit Milchgeldabzug geahndet wird, ist das Antibiotika-haltige Produkt bei Überschreitung der jeweiligen Höchstmengen gemäß lebensmittelrechtlicher Bestimmungen nicht verkehrsfähig. In den amtlichen Erläuterungen zur 5. Verordnung zur Änderung der Milch-Güte Verordnung wird deutlich gemacht, dass eine Hemmstoffuntersuchung nicht die Untersuchungen aus lebensmittelrechtlicher Sicht abdeckt (SUHREN 2002a).

Tabelle 2.2: Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände – Rechtliche Rahmenbedingungen (nach SUHREN 2002b)

Milcherzeuger	Molkereien	Lebensmittelüberwachung
Lebensmittelrecht → Tierarzneimittelrückstände < MRL		
§ 10 LFGB: Stoffe mit pharmakologischer Wirkung		§ 10 LFGB: Stoffe mit pharmakologischer Wirkung; VO (EU) 470/2009
§ 58 AMG: Anwendung bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen		Richtlinie 96/23/EG: nationaler Rückstandskontrollplan
neues EU-Lebensmittel Hygienerecht, Verordnung (EG) Nr.853/2004: Hygienevorschriften für die Rohmilcherzeugung, Hygienevorschriften für Milcherzeugerbetriebe	neues EU-Lebensmittel Hygienerecht, Verordnung (EG) Nr.853/2004: Kriterien für Rohmilch	neues EU-Lebensmittel Hygienerecht, Verordnung (EG) Nr.854/2004: Kontrollen von Milcherzeugungsbetrieben, Kontrolle der Rohmilch bei der Abholung
Qualität → Hemmstoffe		
§2 Milch-Güte-Verordnung		

2.2 Penicilline

2.2.1 Allgemeines

Penicilline gehören, ebenso wie die Cephalosporine, zu den β -Laktam-Antibiotika. Die veterinärmedizinisch wichtigsten Vertreter der Gruppe der Penicilline sind das Benzylpenicillin (Penicillin G) und seine Salze, die Isoxazolylpenicilline, die Aminopenicilline und die Phenoxypenicilline (Penicillin V).

Die antibakterielle Wirkung von Penicillin wurde im Jahr 1929 erstmals von Alexander Fleming beschrieben. Im Gegensatz zu dieser ersten, von einer Schimmelpilzkultur isolierten bakteriolytisch wirksamen Substanz, dem Penicillin F, wird das einige Jahre später entdeckte Benzylpenicillin (Penicillin G) auch heute noch vielfach eingesetzt und ist bei vielen Indikationen Mittel der ersten Wahl (FLEMING 1929; KROKER et al. 1996). Das Wirkungsspektrum von Penicillin G umfasst die meisten grampositiven Bakterienarten, die Lücke der Penicillinase-bildenden Staphylokokken wird durch die Isoxazolylpenicilline (Penicillinase-fest) geschlossen, die Aminopenicilline erfassen Enterokokken und Listerien und erweitern das Spektrum auch in den Bereich der gramnegativen Stäbchenbakterien (ROSIN 1992).

2.2.2 Struktur und Charakteristika

Penicilline werden teilweise noch heute biosynthetisch aus *Penicillium notatum/chrysogenum* gewonnen. Das Grundgerüst aller Penicilline bildet die 6-Aminopenicillan-Säure (6-APS), ein bicyclisches Dipeptid aus Cystein und Valin, die einen β -Laktam-Ring und einen Thiazolidinring formen (Abb. 2.1). Die verschiedenen natürlichen (z. B. Benzylpenicillin) und halbsynthetischen (z. B. Isoxazolylpenicilline und Aminopenicilline) Penicilline unterscheiden sich vor allem in der Seitenkette, die durch Kondensation zwischen einer Carboxylgruppe und der Aminogruppe der 6-APS resultiert (HOU und POOLE, 1971).

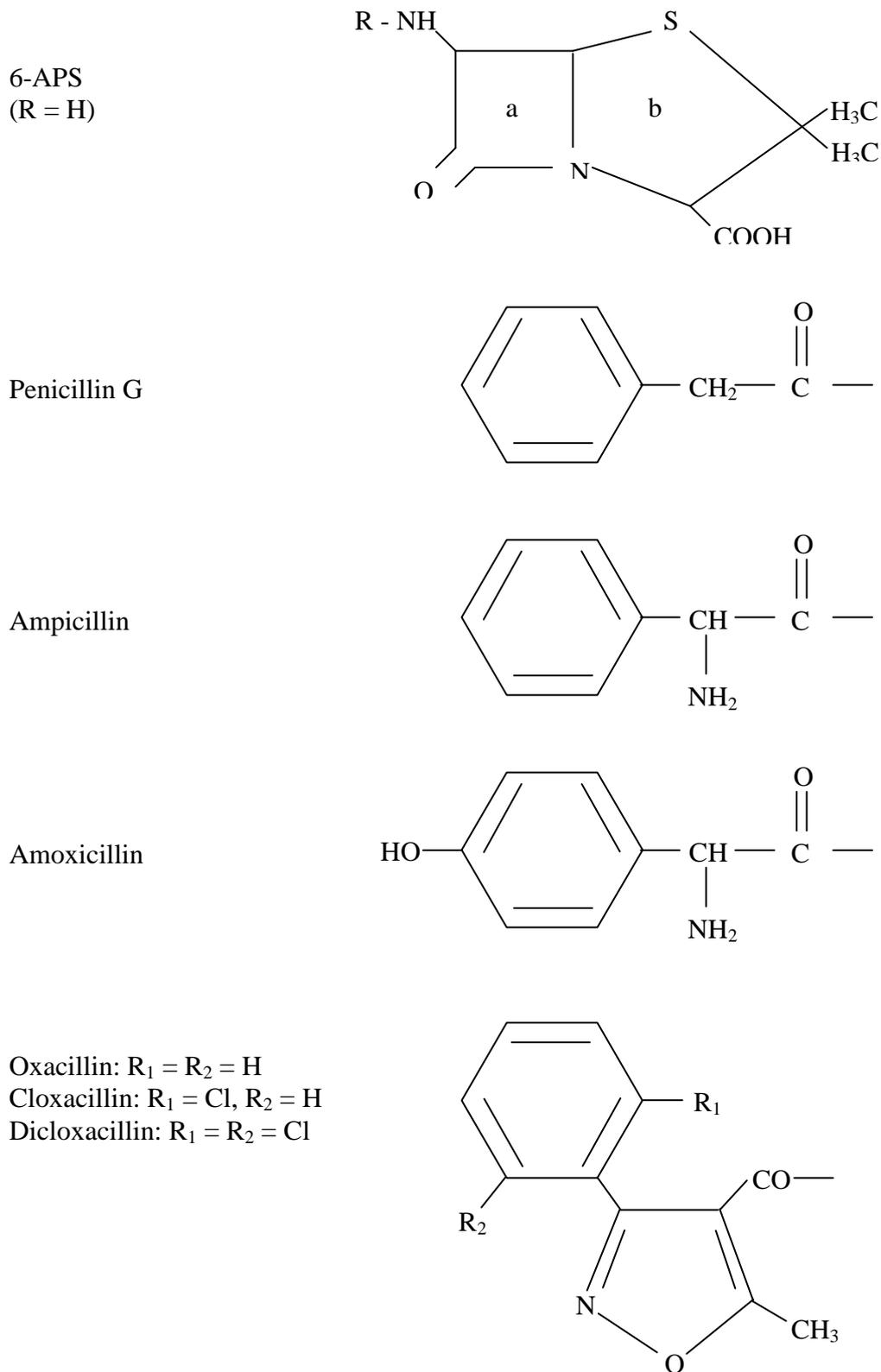


Abbildung 2.1: Strukturformeln der 6-Aminopenicillansäure sowie die durch Variation der Seitenkette (R) entstandenen wichtigen Penicilline. Das 6-APS-Grundgerüst wird von einem β -Laktam-Ring (a) und einem Thiazolidinring (b) gebildet.

Die Seitenketten der Penicilline beeinflussen ihre Stabilität sowohl im sauren und alkalischen Milieu als auch gegen einen Angriff durch von verschiedenen Bakterien gebildeten Enzymen (insbesondere die Penicillinasen). Im alkalischen Milieu sind alle Penicilline instabil, im sauren besonders das Benzylpenicillin. Eine gute Penicillinasefestigkeit erreichen die Isoxazolympenicilline durch längere „sperrige“ polare Seitenketten, die für den Angriff der Penicillinasen auf die β -Laktam-Bindung ein sterisches Hindernis sind, während die antibakterielle Wirkung der anderen Penicilline durch enzymatische Aufspaltung des β -Laktam-Ringes aufgehoben wird (HOU und POOLE, 1971; ROSIN 1992).

Benzylpenicillin weist von allen Penicillinen in ungepufferten wässrigen Lösungen die geringste Stabilität auf. Hauptspaltprodukt des Abbaus ist die nicht antibiotisch wirksame Benzylpenicilloylsäure (BPO) (HOU und POOLE, 1971). BPO ist in Kuhmilch nicht länger nachweisbar als Rückstände von intaktem Penicillin (ROHNER et al. 1985).

Beim Nachweis von Penicillinen in wärmebehandelter Konsummilch ist zudem zu berücksichtigen, dass teilweise ein erheblicher Abbau erfolgen kann, insbesondere bei Sterilmilch (120 °C, 20 min). Hier stellten ZORRAQUINO et al. (2008) z.B. für Ampicillin und Amoxicillin eine Reduktion der Hemmstoffwirkung von über 88% fest. Hingegen scheint eine Ultrahocherhitzung aufgrund der kurzen Zeit (z.B. 140 °C, 10 sec) nur eine vergleichsweise geringere Reduzierung der mittels mikrobiologischer Testsysteme nachweisbaren antimikrobiellen Wirksamkeit zu bewirken (ZORRAQUINO et al., 2008).

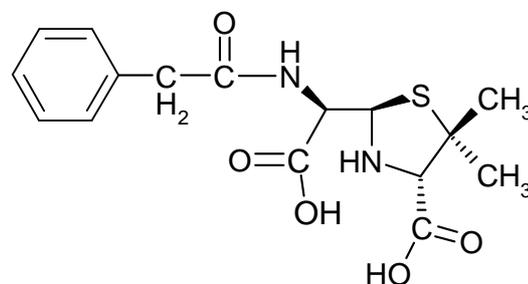


Abbildung 2.2: Strukturformel der Benzylpenicilloylsäure

2.2.3 Wirkungsprinzip

Das Wirkungsprinzip der Penicilline ist an den β -Laktam-Ring geknüpft. Dieser geht unter Aufspaltung eine meist kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum der Murein-Transpeptidase ein, einem Enzym, das für die Quervernetzung des Mureins der Bakterienzellwand notwendig ist, so dass die in der Wachstumsphase der Bakterien erfolgende Einlagerung von Glykosidsträngen in die Zellwand gestört ist. Über die entstehenden Lücken kommt es infolge des wachsenden Innendrucks der Bakterienzelle zur Lysis (bakterizider Wirktyp). Aufgrund dieses Wirkungsmechanismus sind nur proliferierende Bakterien betroffen und β -Laktam-Antibiotika sind für tierische Zellen, die keine Zellwand besitzen, nicht zytotoxisch wirksam (KROKER 1994).

2.3 Nachweisverfahren für Penicillin-Rückstände in Milch

Zum Nachweis von Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurden eine Vielzahl von Methoden beschrieben, welche sich in mikrobiologische, physikalisch-chemische und immunologische Verfahren einteilen lassen. Es gibt jedoch nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand keine einzelne Methode, mit der alle Antiinfektiva auf MRL-Niveau erfasst werden können, noch nicht einmal alle β -Lactam-Antibiotika sind gleichzeitig einfach, kostengünstig und quantitativ bestimmbar (SUHREN, 2002a und b; KANTIANI et al., 2009a). Für Schaf- und Ziegenmilch gibt es deutlich weniger Studien, wobei hinsichtlich der Testeignung teilweise deutliche Unterschiede zur Kuhmilch existieren (SIERRA et al., 2009)

2.3.1 Mikrobiologische Hemmstofftests

2.3.1.1 Allgemeines zu mikrobiologischen Hemmstofftests

Mikrobiologische Hemmstofftests werden seit Jahrzehnten als Referenz- und Routineverfahren zum Nachweis von Hemmstoffen in Kuhmilch eingesetzt. Da das Vorkommen von antimikrobiell wirksamen Rückständen sehr selten ist, ergibt sich die Notwendigkeit von einfach und kostengünstig durchzuführenden Tests, mit denen eine Vielzahl der Substanzen mit ausreichender Empfindlichkeit erfasst werden kann. Mikrobiologische Hemmstofftests spielen als derartige Suchtests eine große Rolle und

wurden in den vergangenen Jahren kontinuierlich weiter entwickelt (ZAADHOF et al., 1997; MITCHELL et al. 1998; SUHREN et al. 1998; NOUWS et al. 1999; KROLL et al., 2000; KANTIANI et al., 2009a).

Das Prinzip mikrobiologischer Hemmstofftests beruht auf dem Nachweis einer Wachstumshemmung empfindlicher Mikroorganismen. Der in Deutschland fast ausschließlich verwendete Testorganismus ist *Bacillus (B.) stearothermophilus* var. *calidolactis*. Aufgrund eines Vorschlags von NAZINA et al (2001) wird diese Spezies zwar mittlerweile dem Genus *Geobacillus* zugeordnet, die korrekte Bezeichnung ist somit *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Zumeist wird in der Hemmstoffprüfung jedoch noch die ältere Bezeichnung verwendet, so dass auch in dieser Arbeit die Bezeichnung *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*. verwendet wird.

Weitere Mikroorganismen, die in mikrobiologischen Hemmstofftests zur Anwendung kommen, sind *B. subtilis*, *B.cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *B. megaterium* und *Streptococcus thermophilus*. Die Nachteile mikrobiologischer Hemmstofftests bestehen darin, dass sie keine Spezifität für bestimmte Antibiotika aufweisen, sich nur für den qualitativen, nicht aber den quantitativen Nachweis eignen, viele Antibiotika nicht auf MRL-Niveau erfassen und zeitaufwändig sind. Eine Klassifizierung der Rückstände in β -Laktame, Nicht- β -Laktame und Sulfonamide ist durch verschiedene Zusätze zum Nährboden (Penicillinase, p-Aminobenzoesäure (PABA)) bedingt möglich (SUHREN und HEESCHEN, 1996; MITCHELL et al., 1998).

Als weiterer Nachteil mikrobiologischer Hemmstofftests wird deren Empfindlichkeit bezüglich milcheigener Bestandteile mit Hemmstoff-Wirkung, wie z.B. Lysozym, Laktoferrin und Laktoperoxidase angeführt (MITCHELL et al., 1998). Während dies bei Kuhmilch zumindest für Anlieferungsmilch keine größere Rolle spielen dürfte, können insbesondere die oftmals widersprüchlichen Resultate bei der Untersuchung von Ziegenmilch mittels mikrobiologischer Hemmstofftests mit der Anwesenheit originärer Hemmstoffe in Verbindung gebracht werden (KLIMA 1980; OELFKEN 1993; ZENG et al., 1996; SCHULZE, 2002).

2.1.3.2 Amtliche Untersuchungsmethodik

Für die Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe sind in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB zwei Methoden zum Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch (**L 01.00-6** und **L 01.01-5**) und zwei Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch (**L 01.00-11** und **L 01.00-62**) sowie der Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Rohmilch und wärmebehandelter Milch (**L 01.00-42 (EG) bis 52 (EG)**) beschrieben.

Methode **L01.00-6** beschreibt den Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Blättchentest. Dazu legt man ein mit der zu untersuchenden Milchprobe getränktes Blättchen auf einen mit *B. stearothermophilus* beimpften Nährboden. In den Agar diffundierte Hemmstoffe verhindern das Keimwachstum rund um das Blättchen, so dass sich eine klare Zone (Hemmhof) bildet. Der Durchmesser des Hemmhofes hängt u.a. von der Art und Konzentration des Antibiotikums in der Probe ab.

Zur Untersuchung von Sammelmilch im Rahmen der Milch-Güte-Verordnung wird statt des Blättchentests häufig der in Methode **L01.01-5** beschriebene Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) angewendet. Dem Testmedium ist Brillantschwarz als Redoxindikator zugesetzt, Testkeim ist wiederum *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Die Auswertung erfolgt anhand der mitanzusetzenden Positivkontrolle (4 µg/kg Benzylpenicillin). Als positiv sind alle Reaktionen zu beurteilen, die mindestens dem blauen Farbton der Positivkontrolle entsprechen.

Im Unterschied zu Methode **L01.01-5** bewertet Methode **L 01.00-11** im Sinne eines Suchverfahrens alle Proben, die nicht die gelbe Reduktionsstufe des antibiotika-freien Kontrollansatzes aufweisen, als positiv. Eine Identifizierung und Quantifizierung der positiven Ergebnisse im Anschluss an den BRT ist vorgesehen.

Die Methode **L 01.00-62** beschreibt ein Suchverfahren auf Tetracycline in Milch und wird daher hier nicht näher beschrieben.

Methode **L 01.00-42 (EG) bis 52 (EG)** beinhaltet unter VIII. ein Referenzverfahren für den Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in roher und hitzebehandelter Milch. Im ersten

Teil dieses Verfahrens werden Milchproben, die Hemmstoffe enthalten selektiert. Dazu wird ein Agar-Nährboden, der den Testkeim *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* und einen Redoxindikator beinhaltet, hergestellt und mit der Milchprobe beimpft. Nach Bebrütung des Nährbodens erfolgt die Auswertung des Tests aufgrund der Nährbodenfarbe. Sind Hemmstoffe in der Milch enthalten, so bleibt die violette Farbe des Redoxindikators unverändert. Der zweite Teil des Verfahrens beinhaltet die Identifizierung (mittels Penicillinase) und Quantifizierung von Penicillin. Der Penicillingehalt wird anhand des Hemmhofes errechnet.

2.3.1.3 Kommerzielle Hemmstofftestsysteme

Eine Reihe mikrobieller Hemmstofftestsysteme sind kommerziell erhältlich. Der BRT, der das in Deutschland überwiegend eingesetzte Routineverfahren für die Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe ist, ist in verschiedenen Modifikationen erhältlich (BRT Hemmstofftest und BRT MRL-Suchtest, (AiM, München), BR-Test AS Brilliant, BR-Test AS Special (DSM Food Specialties, Delft, Niederlande)). Zu den kommerziell angebotenen Testsystemen mit pH-Indikator gehören unter anderem der Delvotest (DSM Food Specialties, Delft, Niederlande), der Cow Side Test und der Blue Yellow Test (Charm Sciences Inc., Lawrence MA, USA). Mikrobielle Hemmstofftestsysteme wurden in zahlreichen Studien evaluiert und detailliert in der Literatur sowie in verschiedenen Dissertationen beschrieben (McGRANE et al. 1996; ZAADHOF et al., 1997; ADRIANY, 1996; VORREITER, 1996; SCHOLZ, 1998; SUHREN, 2002a). Die Nachweisgrenzen dieser Testsysteme sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Der BRT, der laut Milchgüteverordnung vorgesehen ist, wird, da er für die Untersuchungen in dieser Arbeit eingesetzt wurde, im Folgenden kurz charakterisiert.

2.3.1.3.1 Brillantschwarz-Reduktionstest

Der Brillantschwarz-Reduktionstest, der 1967 von KRAACK und TOLLE entwickelt wurde, erfolgt nach dem Prinzip des Agar-Diffusionstests. Das Testmedium, welchem der Testkeim (*B. stearothermophilus* var. *calidolactis*) und der Redoxfarbstoff Brillantschwarz zugesetzt sind, befindet sich in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten. Die zu untersuchenden Milchproben werden in diese Kavitäten hinein pipettiert. Eventuell vorhandene Hemmstoffe

diffundieren während der Inkubationszeit (ca. 3 Stunden bei 65 °C) in das Testmedium. Die wachsenden Testkeime überführen den Redoxindikator (Brillantschwarz) durch Spaltung zweier Azobindungen in seine gelbe bzw. farblose Reduktionsstufe; das Testmedium entfärbt sich von blau nach gelb. Sind Hemmstoffe in der Probe vorhanden, kommt es zu keinem oder nur einem geringfügigen Wachstum der Testkeime. Folglich bleibt eine Reduktion des Farbstoffes aus oder findet nur in eingeschränktem Maß statt; das Testmedium bleibt blau.

Dieser Test wurde speziell für den Nachweis von Hemmstoffen in Milch entwickelt und zeichnet sich durch eine besonders hohe Sensitivität gegenüber β -Laktam-Antibiotika-Rückständen aus. Penicilline werden auf MRL- Niveau sicher erfasst. Aber auch andere Antibiotika und Sulfonamide werden nachgewiesen.

Tabelle 2.3: Nachweisgrenzen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) kommerzieller Hemmstofftestsysteme für in dieser Arbeit eingesetzte Antiinfektiva (Herstellerangaben)

Antininfektivum	BRT Hemm- stofftest	BRT MRL Suchtest	BR-Test AS Brilliant	BR-Test AS Special	Delvotest SP	Charm Blue Yellow Test	Charm Cow Side Test
Penicillin G	2-3	1,5-2	4	1-2	2,5	3-4	3-4
Ampicillin	2-3	2-3	4	2-3	3-5	5	5
Amoxicillin	2-3	1-2	3-4	2-3	3-5	5-6	6
Nafcillin	10-15	5	k. A.	k. A.	5-10	k. A.	k. A.
Cloxacillin	20-30	10	k. A.	k. A.	15-25	30-50	30-50
Dicloxacillin	10-20	5	k. A.	k. A.	10-15	k. A.	k. A.
Oxacillin	10-20	5	k. A.	k. A.	10	300	200-300
(Dihydro-) Streptomycin	1000	400-600	k. A.	k. A.	1500- 10000	k. A.	k. A.
Tetracyclin	200-400	100-200	100-300	100-300	200-600	k. A.	k. A.
Cefacetril	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	20-40	k. A.	k. A.
Cefalexin	300	200	25-30	20-30	60-100	k. A.	k. A.
Cefalonium	10	5	k. A.	k. A.	10-25	k. A.	k. A.
Cefapirin	5	5	k. A.	k. A.	5-10	10	10
Cefazolin	25	25	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Cefoperazon	20-30	20	k. A.	k. A.	60-100	k. A.	k. A.
Ceftiofur	k. A.	70-100	k. A.	k. A.	50-70	50-100	50-100
Cefquinom	k. A.	40-60	100	90	k. A.	k. A.	k. A.

2.3.1.4 Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch mittels mikrobiologischer Testsysteme

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch mittels mikrobiologischer Testsysteme liegen nur wenige Untersuchungen vor, deren Resultate teilweise in Widerspruch zueinander stehen (CONTRERAS, 1997; SCHULZE 2002; ALTHAUS et al., 2003; SIERRA et al., 2009).

Der Blättchentest wurde erstmals von KLIMA (1980) mit Ziegenmilch durchgeführt. Im Gegensatz zum BRT erbrachte der Blättchentest mit dem ursprünglich von KUNDRAT (1968) isolierten *B. stearotherophilus* der Fa. MERCK fast ausschließlich falsch-positive Ergebnisse und erwies sich somit als nicht geeignet. OELFKEN (1993) hingegen, der 229 Ziegenmilchproben mit dem BRT untersuchte, stellte fest, dass es sich bei den im BRT positiven Ergebnissen (78 Proben) um unspezifische Reaktionen handelte. Diese konnten mit dem Blättchentest (Methode L01.00-6), der sich für diese Untersuchung als geeignet darstellte, nicht bestätigt werden. Der kommerziell erhältliche Blättchentest der Fa. Charm Sciences wurde für die Untersuchung von Ziegenmilch als sensitiv und verlässlich beschrieben (CONTRERAS et al., 1997; ZENG et al., 1998). Ein späterer Vergleich des Blättchentests mit dem Delvotest SP ergab, dass der Delvotest eine vielfach höhere Sensitivität aufwies und sich auch aufgrund seiner niedrigen Nachweisgrenzen für β -Laktam-Antibiotika in Ziegenmilch sehr gut für den Routine Einsatz eignet (HOZOVA und MINAROVICOVA, 2001).

SCHULZE (2002), die die Tauglichkeit der konventionellen und einer modifizierten Form des Blättchentests mit verschiedenen kommerziellen mikrobiologischen Testsystemen verglich, stellte fest, dass der Blättchentest in seiner modifizierten Form mit einer Dialysiermembran das geeignetste Testsystem für die Untersuchung von Ziegenmilch ist.

Unter den kommerziell erhältlichen Hemmstofftestsystemen wird der Delvotest von verschiedenen Autoren als sehr gut geeignet eingestuft (CONTRERAS et al., 1997; ANTIFANTAKIS et al., 1988; HOZOVA und MINAROVICOVA, 2001; SCHULZE, 2002; SIERRA et al., 2009). Im Gegensatz zu ZENG et al. (1996), der 7 % falsch positive Resultate im Delvotest P fand, stellt das Auftreten dieser falsch positive Reaktionen laut neueren Untersuchungen mit dem Delvotest SP kein Problem dar. Bei einer 15minütigen

Verlängerung der Inkubationszeit ergeben sich über 99 % negative Reaktionen (SCHULZE, 2002).

Die verschiedenen Modifikationen des BRT sind für den Nachweis von Antiinfektiva in Ziegenmilch zumeist nur eingeschränkt geeignet. Am ehesten bietet sich noch der BR-Test As Special (bei verlängerter Inkubationszeit um 30 Minuten) an. Der BRT Hemmstofftest, BRT MRL Suchtest, BR-Test AS und AS Brilliant sind aufgrund noch längerer Inkubationszeiten und des Auftretens unspezifischer Reaktionen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen, nur mit Einschränkungen geeignet (SCHULZE, 2002). Über die notwendige Verlängerung der Inkubationszeit wurde auch schon von SCHOLZ (1998) berichtet. Eine neuere Untersuchung (SIERRA et al., 2009) zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Ziegenmilch beschreibt den BRT AiM als sehr gut geeignet für den Nachweis der in dieser Studie eingesetzten Antibiotika. Bei sieben von acht Substanzen lag die Nachweisgrenze auf oder unter MRL-Niveau.

Falsch positive Resultate werden auf die Anwesenheit originärer Hemmstoffe in der Ziegenmilch, insbesondere Lysozym und Laktoferrin, zurückgeführt (KLIMA, 1980; OELFKEN, 1993; ZENG et al., 1996). Die antimikrobiell wirkende Laktoperoxidase ist von untergeordneter Bedeutung, da sie nach einigen Sekunden bei 80 °C fast vollständig inaktiviert wird (KIERMEIER und KAYSER 1960; GRIFFITHS, 1986). Vermutungen, dass auch kurzkettige Fettsäuren Ursache von unspezifischen Reaktionen sind, konnten ebenfalls widerlegt werden (SCHULZE, 2002).

2.3.2 Immunologische Verfahren und Schnelltestsysteme

Bei immunologischen Verfahren wird als Nachweisprinzip die Fähigkeit von Antikörpern genutzt, spezifische molekulare Strukturen von bestimmten Stoffen zu erkennen und zu binden. Während früher das Ergebnis vor allem durch radioaktive Markersubstanzen (Radio Immunassay = RIA) sichtbar gemacht wurde, stehen heute verschiedene Enzymreaktionen (Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest = EIA) und fluoreszierende bzw. lumineszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay = FIA) im Vordergrund (ALLEN, 1989; SMITH, 1989; MÄRTLBAUER, 1993).

2.3.2.1 Enzymimmuntests

Immunochemische Nachweisverfahren stellen eine etablierte Technik zur Untersuchung großer Probemengen im Sinne eines Screening-Verfahrens dar. Die Immuntests bieten die Möglichkeit zur Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände und sind einfach und hinsichtlich des apparativen Aufwandes kostengünstig durchführbar (MÄRTLBAUER et al., 1994; USLEBER et al., 1994; SPINKS, 2000). Eine Sonderform stellen die sogenannten „Biosensoren“ dar, die beispielsweise als „surface plasmon resonance“ oder als „microarray“ System beschrieben wurden (z.B. GAUDIN et al., 2001; KNECHT et al., 2004). Dies sind im Prinzip immunologische Verfahren, bei denen einige Reaktionsschritte automatisiert (z.B. mittels Pumpen) durchgeführt werden. Da diese Testformen in der Praxis noch keine Rolle spielen, soll nicht weiter darauf eingegangen werden.

Da es sich bei den nachzuweisenden Antiinfektiva um niedermolekulare Substanzen handelt, die nur eine Antikörperbindungsstelle aufweisen, kann in der vorliegenden Arbeit nur das kompetitive System der Immuntests Anwendung finden. Beim direkten kompetitiven Enzymimmuntest konkurrieren freie Probenantigene und enzymmarkierte Antigene um eine begrenzte Anzahl von spezifischen Antikörperbindungsstellen. Die spezifischen Antikörper werden zuvor entweder unmittelbar oder über einen zweiten Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik, Double Antibody Solid Phase, DASP) an die Festphase gebunden. Beim indirekten Nachweis wird das Antigen-Protein-Konjugat auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) aufgebracht und konkurriert mit freiem Analyten (Probenantigen) um die begrenzte Anzahl von spezifischen Antikörperbindungsstellen. Dabei werden umso weniger Antikörper an die Festphase gebunden, je höher die Analytkonzentration in der Probe ist. Um die gebundenen Antikörper bestimmen zu können, werden sie entweder direkt markiert oder über einen zweiten, tierartsspezifischen enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen. Diese Bindungsreaktionen werden sowohl im direkten als auch im indirekten System nach Zugabe von entsprechendem Enzymsubstrat farbig sichtbar. Der Substratumsatz ist umso geringer, je mehr Analytmoleküle in der Probe waren. Das Testergebnis verhält sich also umgekehrt proportional zu der Konzentration des gesuchten Antigens.

Einen Überblick über die Entwicklung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs geben USLEBER et al. (1994). Die Entwicklung eines für Penicillin G spezifischen

Enzymimmuntests gelangen JACKMAN et al. (1990). Der gruppenspezifische Nachweis von Penicillinen, der für die Lebensmittelkontrolle von höherer Bedeutung ist, wurde 1995 von LITZ beschrieben und konnte durch die von STRASSER (2003) hergestellten Antikörper noch verbessert werden. Ein sehr ähnlicher Test (FITZGERALD et al. 2007) wird kommerziell vermarktet (Randox Laboratories, Crumlin, Nordirland). Einen immunologischen Nachweis des Penicillin G-Metaboliten Benzylpenicilloylsäure (BPO), der als Bestätigungstest für das Vorhandensein von Penicillin G in Milch durchgeführt werden kann, wurde 1983 von ROHNER entwickelt. LITZ (1995) und FLOSS (1997) etablierten ein hochspezifisches enzymimmunochemisches Nachweisverfahren für BPO-Derivate, dessen Vorteil die äußerst geringe Sensitivität für die Muttersubstanz Penicillin G ist, die bei natürlichem Probenmaterial oft gleichzeitig in höheren Konzentrationen vorhanden ist. Für die Isoxazolympenicilline (Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin) spezifische Enzymimmuntests wurden ebenfalls beschrieben (USLEBER et al. 1994, DIETRICH et al. 1996). Zeitgleich mit der vorliegenden Arbeit wurden Enzymimmuntests zum Nachweis diverser Cephalosporine entwickelt (THAL 2006; MEIER 2008). Tab. 2.4 enthält eine Auswahl der in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen klassischen Enzymimmuntests zum Nachweis verschiedener Antiinfektiva.

Um immunologische Verfahren auch in kürzest möglicher Zeit als Schnelltests einzusetzen, wurden die herkömmlichen Standardverfahren zunehmend vereinfacht und modifiziert. So liegt ein direkter kompetitiver Enzymimmuntest zum Nachweis von β -Laktam Antibiotika in Milch als Röhrchenschnelltest vor (LacTek Test, IDEXX Laboratories, Inc., USA). Die Nachweisempfindlichkeit dieses kommerziell erhältlichen Testsystems beträgt für Penicillin G 5 ng/ml, für Ampicillin, Amoxicillin und Cloxacillin 10 ng/ml, in höheren Konzentrationen werden auch Cephalosporine erfasst (Cefapirin 20 ng/ml, Ceftiofur 50 ng/ml) (SCHNEIDER et al., 1994).

Tabelle 2.4: Untersuchung von Milch auf Penicilline und weitere in dieser Arbeit eingesetzte Antiinfektiva unter Verwendung enzymimmunologischer Verfahren

Substanz (Immunogen)	Art des Antikörpers (immunisierte Tierart)	EIA- Methode	NWG (ng/ml)	Kreuzreaktionen mit (%)	Referenz
Penicillin G (Pen G-OVA)	polyklonal (Schaf)	direkt	6	Penicillin G (100) Penicillin V (5,5) Pheneticillin (1,5) Benzylpenicilloyl- säure (2,6)	JACKMAN et al. (1990)
Penicilline gruppen- spezifisch (Ampi-BSA)	polyklonal (Kaninchen)	direkt	0,5-1 (Penicillin G)	Penicillin G (100) Ampicillin (64) Amoxicillin (24) Oxacillin (100) Cloxacillin (29) Dicloxacillin (27) Nafcillin (120) Piperacillin (41) Azlocillin (104) Metampicillin (38) Penicillin V (45)	STRASSER (2003)
Ampicillin (Ampi-KLH)	monoklonal (Maus)	direkt	11,7	Amoxicillin (187) Penicillin G (31) Cloxacillin (30) Dicloxacillin(44) Oxacillin (14)	DIETRICH et al. (1998)
Ampicillin (Ampi-BSA)	polyklonal (Schaf)	direkt	2	Ampicillin (100) Nafcillin (144) Amoxicillin (94) Piperacillin (92) Azlocillin (89) Cloxacillin (69) Penicillin G (56) Dicloxacillin (52) Oxacillin (51) Metampicillin (30) Penicillin V (22)	FITZGERALD et al. (2007)

Fortsetzung Tabelle 2.4:

Substanz (Immunogen)	Art des Antikörpers (immunisierte Tierart)	EIA- Methode	NWG (ng/ml)	Kreuzreaktionen mit (%)	Referenz
Benzylpen- icilloylsäure (BPO-HSA)	polyklonal (Kaninchen)	direkt	10	Penicillin G (10)	ROHNER et al. (1985)
Benzylpen- icilloylsäure (BPO-BSA)	polyklonal (Kaninchen)	direkt	0,4	Penicillin G (0,67)	LITZ (1995)
Cloxacillin (Cloxa-HSA)	polyklonal (Kaninchen)	direkt	3	Oxacillin (k. A.) Dicloxacillin (k. A.)	USLEBER et al. (1994)
Cloxacillin (Cloxa-HSA)	monoklonal (Maus)	indirekt	0,9	Oxacillin (11) Dicloxacillin (330)	DIETRICH et al. (1996)
Streptomycin (Strep-OVA)	polyklonal (k. A.)	direkt	1,5	k. A.	MITCHELL et al. (1992)
Streptomycin (Strep- Hydrazon- BSA)	polyklonal (Kaninchen)	direkt DASP	0,6	Dihydrostreptomycin (148)	SCHNAPPINGER (1992)
Tetracyclin (Tetra-BSA)	polyklonal (Kaninchen)	indirekt	0,1	Chlortetracyclin (101) Rolitetracyclin (110) Minocyclin (127) Demeclocyclin (37) Oxytetracyclin (4)	LANG et al. (1992), MÄRTLBAUER (1993)
Cephalexin (Cephalexin- KLH)	polyklonal (Kaninchen)	direkt	0,2	Cefaclor (53) Cefadroxil (55) Cephradin (82)	MEIER (2008)
Ceftiofur (Ceftiofur- KLH)	polyklonal (Kaninchen)	indirekt	1,9–3,3	Cefotaxim (10) Cefuroxim (20) Ceftriaxon (29) Ceftiofur-Metabolit (5)	MEIER (2008)
Cefquinom (Cefquinom- KLH)	polyklonal (Kaninchen)	indirekt	1-2	Keine Kreuzreaktionen mit 25 getesteten β - Laktam-Antibiotika	THAL (2006)

2.3.2.2 Schnelltests zum Nachweis von β -Laktam-Antibiotika

Schnelltestsysteme werden in den letzten Jahren zunehmend verwendet, denn seitens der Milchindustrie besteht die Nachfrage nach schnellen, einfach durchzuführenden, verlässlichen Testsystemen, die eine möglichst große Bandbreite von Antibiotika und Sulfonamiden abdecken. Da β -Laktam-Antibiotika, insbesondere Penicillin G, das von Tierärzten meist eingesetzte Antibiotikum bei Milchkühen und somit auch der am häufigsten nachgewiesene Hemmstoff in Milch ist, werden in der Praxis zumeist β -Laktam Schnelltests eingesetzt. Molkereiunternehmen können Milch bereits auf Tankwagenebene untersuchen und ein Überschreiten von MRLs im Endprodukt sowie technologische Probleme vermeiden (SUHREN und REICHMUTH, 1998; DEGELAEN, 1994). Ein Einsatz der Schnelltests im landwirtschaftlichen Betrieb kann zur Vermeidung von Hemmstoff-positiven Befunden ebenfalls hilfreich sein. Um Schlussfolgerungen aus der Untersuchung von Sammelmilch- oder Einzelgemelken ziehen zu können, müssen Landwirt oder Haustierarzt die Grenzen der Tests (Sensitivität und Spezifität) kennen (MUSSER und ANDERSON, 1999). Die Vorteile der Schnelltests zum Nachweis von β -Laktam-Antibiotika sind ihre einfache Handhabung, kurze Analysenzeit (ca. 10 min) und Gruppenspezifität, sie weisen aber auch Nachteile, wie Beeinflussbarkeit der Testergebnisse durch pH-Wert, Zellzahl oder Keimzahl, teilweise unzureichende Testsensitivität und apparativen Aufwand (Heizblock) auf (KROLL, 2000).

Die Eignung von Schnelltestsystemen zum Antibiotikarückstandsnachweis in Milch wird in verschiedenen Dissertationen ausführlich beschrieben (KROLL, 2000; QUANDT, 2006). In der vorliegenden Arbeit kamen die kommerziellen Rezeptortests Beta s.t.a.r. und Snap-Test zum Einsatz. Das gemeinsame Prinzip der Rezeptortests beruht auf dem Einsatz von Rezeptorproteinen (vermutlich isoliert aus Bakterien), die, ähnlich wie beim Enzymimmuntest, zur Detektion in kompetitiven Systemen eingesetzt werden.

2.3.2.2.1 Beta s.t.a.r.

Der Beta s.t.a.r. (CHR. HANSEN GmbH, Nienburg) ist ein indirekt kompetitiver Rezeptorbindungstest. Die zu untersuchende Milchprobe wird in einem ersten Inkubationsschritt (47,5 °C, 3 min) mit dem Rezeptorprotein-Goldkonjugat vermischt. In der Probe vorhandene β -Laktam-Antibiotika werden spezifisch gebunden. Zu Beginn der zweiten Inkubationsphase (2 min) wird ein Teststreifen in die Lösung gesteckt. Die Lösung wandert

mittels Kapillarmigrationskräften über die Membran des Teststreifens (lateral flow). Im Ergebnisbereich ist die Membran quer zur Laufrichtung der Flüssigkeit mit β -Laktam-Antibiotika beschichtet, an die freie Rezeptoren binden. Enthält die Milchprobe keine Rückstände von β -Laktam-Antibiotika, besetzen die Rezeptoren die Antibiotika-Beschichtung der Membran und durch Akkumulation der an die Rezeptoren gebundenen Goldpartikel entsteht eine rote Bande. Befinden sich β -Laktam-Antibiotika in der Probe, binden diese in der ersten Inkubationsphase an die freien Rezeptoren und es bildet sich in der zweiten Inkubationsphase keine Farbbande. Oberhalb der Testbande ist zur Kontrolle des Testablaufs eine Referenzanzeige vorhanden. Zusätzlich zur visuellen Auswertung ist auch die instrumentelle Auswertung des Tests möglich. In Tabelle 2.5 sind die Herstellerangaben zur Nachweisempfindlichkeit des β s.t.a.r.-Tests aufgelistet. KROLL et al. (2000) sowie ABOUZIED et al. (2009) überprüften die Testeigenschaften des β s.t.a.r.-Tests auch unter dem Aspekt der Testrobustheit und kamen jeweils zu einer positiven Bewertung.

2.3.2.2.2 SNAP-Beta-Laktam Test

Der SNAP-Beta-Laktam Test (IDEXX GmbH, Wörstadt) ist ein indirekt kompetitiver enzymgebundener Rezeptortest (enzyme-linked receptor binding assay). Die zu untersuchende Milchprobe und der Enzym-gebundene Rezeptor werden in einem ersten Schritt zusammen inkubiert (45 °C, 5 min). Gegebenenfalls in der Probe vorhandene β -Laktam-Antibiotika werden spezifisch gebunden. Das Probengemisch wird in einem zweiten Schritt in die Testkammer des SNAP-Testers gegeben. Die Probe fließt aufgrund der Kapillarkwirkung entlang der Testmembran zu dem mit β -Laktam-Antibiotika beschichteten Probenfeld. Falls noch ungebundene Rezeptoren im Probengemisch vorhanden sind, binden diese hier. Durch Drücken des „Aktivators“ wird in einem dritten Schritt das Substrat aus dem Reagenzienreservoir freigesetzt und wandert über das Fließpapier in Richtung Probenfeld. Die farblose Substrat-Chromogen-Lösung wird proportional zu der Menge der gebundenen Rezeptorproteine enzymatisch in eine blaue Form überführt. Die Farbintensität ist somit umgekehrt proportional zur Menge der β -Laktam-Antibiotika in der Probe. Zur Auswertung des Tests erfolgt ein Vergleich des Probenfeldes mit einem Kontrollfeld. Das Ergebnis ist ungültig, wenn keine Farbentwicklung im Bereich des Kontrollfeldes sichtbar ist (SUHREN und REICHMUTH, 1998). Die Auswertung des Tests kann visuell oder instrumentell (Snapshot Reader) erfolgen. In Tabelle 2.5 sind die Herstellerangaben zur

Nachweisempfindlichkeit des Tests aufgelistet. KROLL et al. (2000) evaluierten den SNAP-Beta-Laktam Test unter Praxisbedingungen und kamen zu einer positiven Bewertung dieses Testsystems.

Tabelle 2.5: Herstellerangaben zur Nachweisempfindlichkeit ($\mu\text{g}/\text{kg}$) des Beta s.t.a.r. (CHR. HANSEN GmbH, 2004) und des SNAP-Beta-Laktam Test (IDEXX Laboratories Inc., 2005)

Hemmstoff	Beta s.t.a.r.	SNAP-Beta-Laktam Test
Penicillin G	2-5	2-3
Ampicillin	3-6	4-6
Amoxicillin	3-6	7-8
Oxacillin	5-10	40-60
Cloxacillin	6-12	30-40
Dicloxacillin	6-12	20-25
Ceftiofur	75-150	5-7
Cefquinom	<20	20
Cefapirin	8-16	10-12
Cefazolin	40-60	15-20
Nafcillin	k. A.	70

2.3.2.3 Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch mittels immunologischer Verfahren und mit Schnelltestsystemen

Daten über Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in Ziegenmilch liegen bisher nicht vor. Einzig der **LacTek** Test (IDEXX Laboratories, Inc., USA), ein direkter kompetitiver Enzymimmuntest als Röhrchenschnelltest wurde hinsichtlich seiner Eignung für Ziegenmilch getestet. Bei diesem Test konkurrieren eventuell in Milch vorhandene Antibiotikarückstände mit enzymmarkiertem Tracer um spezifische Antikörper, die sich auf der Innenseite des Teströhrchens befinden. Die Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika in der Milch reduziert die Menge des Tracers, der an der Innenseite des Röhrchens bindet und somit auch die Intensität der Farbentwicklung. Die Farbintensität, die in einem Spektrophotometer gemessen und mit der eines Penicillin-Standards verglichen wird, verhält sich umgekehrt proportional zur β -Laktam-Antibiotika Konzentration in der Probe. Der LacTek Test ist in mehreren Modifikationen erhältlich, LacTek B-L dient dem

Nachweis von Penicillin-Rückständen und LacTek CEF dem Nachweis von Ceftiofur-Rückständen. Beide Testversionen wurden in einer Studie mit 935 Ziegenmilchen eingesetzt, und mit einer Selektivitätsrate von 1,0 bewertet (keine falsch positiven Ergebnisse). Von den mit Penicillin G und Ceftiofur versetzten Kontrollproben wurde eine mit 5 ppb Penicillin G dotierte Probe vom Lactek B-L falsch negativ getestet (CONTRERAS et al., 1997). Im Rahmen einer Untersuchung aus dem Jahr 1998 wurde der LacTek CEF Test als sehr gut geeignet zum Nachweis von Ceftiofur in Ziegenmilch beschrieben, der LacTek B-L erbrachte eine Reihe falsch negativer Ergebnisse. Von 30 mit 5 ppb Penicillin G versetzten Ziegenmilchen wurden nur 24 als antibiotikahaltig erkannt (Spezifität 80 %). Die Ergebnisse für Amoxicillin, Ampicillin und Cloxacillin lagen in ähnlichen Bereichen. Die Spezifität beider Testsysteme wurde mit 100 % angegeben (ZENG et al., 1998).

Zur Eignung von weiteren Schnelltestsystemen zum Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch liegen folgende Untersuchungen vor:

Der enzymatische **Penzym** Test (Chr. Hansen GmbH, Nienburg), dessen Prinzip auf der Inaktivierung des Enzyms Carboxypeptidase durch β -Laktam-Antibiotika beruht, wird wegen seiner hohen Sensitivität und Spezifität und kurzer Analysenzeit als geeigneter Screeningtest für Ziegenmilch beschrieben (ZENG et al., 1996). Bei einer Untersuchung von 935 Ziegenmilchen fand sich mit dem Penzym Test ein falsch positives Ergebnis. Zur Kontrolle wurden mit 5 ppb dotierte Milchen eingesetzt (CONTRERAS et al., 1997). In neueren Untersuchungen (HORZOVA und MINAROVICOVA 2001) wird der Penzym S 100 Test ebenfalls als geeignet für die Routineuntersuchungen von Ziegenmilch beschrieben. Bei einer orientierenden Untersuchung zum Nachweis von β -Laktam-Antibiotika in Ziegenmilch mit kommerziellen Schnelltests (SCHULZE 2002) wurde der Penzym 50 Test hinsichtlich seiner Sensitivität als nur mit Einschränkungen geeignet beschrieben. Zwei mit 4 ppb Benzylpenicillin dotierte Milchproben ergaben jeweils ein negatives Testergebnis.

Über den Rezeptortest **SNAP-Beta-Laktam Test** liegen ebenfalls unterschiedliche Aussagen vor. Dieser Test wird als sensitives und verlässliches System zum Auffinden von Antibiotikarückständen in Ziegenmilch beschrieben. Bei der Untersuchung von 30 hemmstofffreien Kontrollproben lag ein falsch positives Ergebnis vor (Spezifität: 96,7%). 180 Milchproben wurden mit β -Laktam-Antibiotika versetzt und als positiv erkannt (Sensitivität: 100 %) (ZENG et al., 1998). Bei einer weiteren Untersuchung von 935 antibiotikafreien Ziegenmilchproben lag kein falsch positives Ergebnis vor (CONTRERAS et al., 1997). In

Gegensatz dazu stehen die neueren Untersuchungen von Schulze (2002). Hier lag der Anteil der Milchproben mit eindeutig negativem Resultat bei Hemmstoff-negativer Ziegenmilch bei 14,3 %. Allerdings kamen bei dieser orientierenden Untersuchung nur 7 Ziegenmilchen zum Einsatz.

Von den kommerziellen Schnelltestsystemen zum Nachweis von β -Laktam Antibiotika in Ziegenmilch wird in der neueren Literatur (SCHULZE 2002) der Rezeptortest **Beta s.t.a.r.** als gut geeignet beschrieben (Untersuchung von sieben Hemmstoff-negativen und zwei mit 4 ppb Benzylpenicillin dotierten Milchproben).

Der **Charm II Beta-laktam Test** (Charm Sciences Inc., USA) wird von mehreren Autoren für die Untersuchung von Ziegenmilch empfohlen. Das Testsystem dieses radioaktiv markierten mikrobiellen Rezeptorbindungstests beruht auf einer Konkurrenz zwischen den mit radioaktivem ^{14}C bzw. ^3H markierten Antibiotika („Tracer“) und den eventuell in der Milch befindlichen Antiinfektiva-Rückständen um spezifische Rezeptorbindungsstellen. Die Hemmstoffkonzentration in der Probe ist umgekehrt proportional zu der Menge des gebundenen radioaktiven Tracers, die mit einem Scintillationszähler ermittelt wird. Untersuchungen von Ziegenmilch mittels Charm II Beta-laktam Test ergaben in den Studien von CONTRERAS et al., 1997 und von ZENG et al., 1998 eine sehr gute Sensitivität und Spezifität. Falsch positive Ergebnisse wurden nicht dokumentiert und von 180 mit β -Laktamen versetzten Antibiotika kam es nur zu einem falsch negativen Ergebnis. In einer Untersuchung aus dem Jahr 2006 an zehn Ziegenmilchproben erwies sich der Charm II Beta-laktam Test ebenfalls als uneingeschränkt geeignet für den Nachweis von Antiinfektiva in Ziegenmilch (QUANDT).

Der **Charm ROSA** („Rapid One Step Assay“) ist ein indirekter kompetitiver Rezeptorbindungstest der von Charm Sciences Inc., USA hergestellt wird. Die goldmarkierten Rezeptorproteine sind auf einem Teststreifen adsorbiert. Nach Aufbringen der Milchprobe reagieren diese gegebenenfalls mit in der Probe enthaltenen Antibiotika, der Rezeptor wird blockiert und eine Bindung an die so genannte Testbande im weiteren Verlauf der durch Kapillarkräfte vermittelten Migration der Flüssigkeit unterbleibt. Die Färbung des Teststreifens durch die Goldpartikel ist somit umgekehrt proportional zur Konzentration der in der Probe enthaltenen Antibiotika. Die Auswertung erfolgt visuell oder instrumentell gegen eine Referenzbande. Dieser Test ist für die Untersuchung von Ziegenmilch gut geeignet. In

einer Untersuchung von zehn Milchproben wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse festgestellt (QUANDT 2006).

Der **Parallux Test** (MEDEXX, Korea) ist ein kompetitiver Festphasen-Fluoreszenz-Immunoassay. Das Probenmaterial wird auf ein Reagenz-Tablett gegeben, dort befinden sich mit einem Fluoreszenz-Konjugat markierte Antikörper. Bei dieser ersten Inkubation binden die Antikörper an eventuelle Antiinfektiva in der Milch. Danach wird die Milch in die Glaskapillaren der Testkartusche aufgezogen, welche mit entsprechenden Antiinfektiva beschichtet sind. Verbleibende freie Antikörper können nun während einer zweiten Inkubationsphase an diese Antiinfektiva binden. Nach einem automatisch durchgeführten Waschschrift, wird die Testkartusche in ein Lesegerät eingelegt, in welchem der gebundene Fluoreszenzfarbstoff mittels Laserstrahlen angeregt wird. Je höher die Fluoreszenz desto weniger Hemmstoff befindet sich in der Probe. Auch dieser Test zeigte weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse bei der Untersuchung von zehn Ziegenmilchproben und erfüllte somit die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität in vollem Umfang (QUANDT 2006).

2.3.3 Physikalisch-chemische Verfahren

Zu diesen zählen colorimetrische, spektrophotometrische, elektrophoretische und chromatographische Verfahren. Die größte Bedeutung kommt den chromatographischen Verfahren zu. Die Auftrennung der einzelnen Substanzen erfolgt mittels Dünnschicht- (DC), Gas- (GC) oder Flüssigkeitschromatographie (z.B. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)). Die klassischen HPLC-Verfahren mit UV-, Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektion werden immer mehr von flüssigkeitschromatographischen Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion (LC/MS-MS) verdrängt (KANTIANI et al., 2009b). Die chromatographischen Methoden sind in der Lage, geringe Rückstandsmengen zu spezifizieren und zu quantifizieren. Als nachteilig wirken sich die hohen Kosten für die Analysengeräte, die Anforderungen an hochqualifiziertes Personal und eine intensive Probenaufarbeitung aus, womit der Einsatz in der Routinediagnostik oder zum Screening größerer Probemengen nur begrenzt möglich ist (BYGRAVE et al., 1995; MITCHELL et al., 1998; BECKER, 2005; BAILON-PEREZ et al., 2009; HSIEH et al., 2009). Einige neuere Entwicklungen im Bereich von Mikroarraysystemen (KNECHT et al., 2004) oder der massenspektrometrische Nachweis

unter Verwendung der Technik der Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) (XU et al., 2010) könnten in der Zukunft eine größere Rolle spielen, sind aber derzeit noch nicht praxistauglich.

Der Nachweis von Hemmstoffen in Ziegenmilch mittels physikalisch-chemischer Verfahren ist ebenfalls möglich, milchwirtschaftlich aber momentan bedeutungslos. Die Untersuchung von Ziegenmilch mit diesen Verfahren diente bisher zumeist Studien mit pharmakokinetischem Hintergrund (RULE et al., 2001; PAYNE et al., 2002; CINQUINA et al., 2003; RULE et al., 2004).

2.3.4 Integriertes Nachweissystem für Tierarzneimittel-Rückstände in Milch

Zur Sicherstellung der technologischen Qualität von Kuhmilch und ihrer Sicherheit für den Verbraucher wurde beim Internationalen Milchwirtschaftsverband (International Dairy Federation = IDF) von HEESCHEN und SUHREN (1996) ein „integriertes Nachweissystem“ entwickelt, das zum einen die Festlegung der Verantwortlichkeiten von Milcherzeuger, Milchverarbeiter und Lebensmittelüberwachung regelt, und zum anderen durch Anwendung verschiedener Methoden bzw. Methodenkombinationen eine bestmögliche Erfassung aller Substanzen gewährleisten soll. Milchproben werden im Rahmen dieses integrierten Systems zunächst mit geeigneten Such- oder Screeningverfahren untersucht. Die Ergebnisse dieser Screeningverfahren müssen vor den Nachweisempfindlichkeiten der eingesetzten Verfahren interpretiert werden. Anschließend können aufwändigere Nachweismethoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Rückständen eingesetzt werden (Abbildung 2.3) (SUHREN 2002a). Eine weitere Analysenstrategie zur Substanzdifferenzierung von β -Laktam-Antibiotika in hemmstoff-positiven Milchproben wird von USLEBER et al. angewandt. Diese, ebenfalls etwas zeit- und arbeitsaufwändige, Methode besteht aus einer Kombination mehrerer verschiedener Testprinzipien, insbesondere der stufenweisen Anwendung von mikrobiologischen Nachweisen, Rezeptortests und Enzymimmuntests (USLEBER et al., 2000; HOLTKÖTTER et al., 2002; KERP et al., 2004; KRESS et al., 2007). Die Untersuchung von Ziegenmilch mittels eines integrierten Nachweissystems ist, nach Auswahl geeigneter Methodenkombinationen, theoretisch ebenfalls möglich. Allerdings wurde ein integriertes Nachweissystem auf Ziegenmilch bisher noch nicht angewandt, wie die Durchsicht der Literatur zeigt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton (reinst)	(Merck KGaA, 1.00013)
Casein-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
Citronensäure-1-Monohydrat	(Merck KGaA, 1.00244)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 472301)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid	(Sigma Chemie GmbH, E-7750)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
Kaliumhydroxidplätzchen	(Merck KGaA, 1.05021)
Magermilchpulver	(Merck KGaA, 1.5363)
Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP)	(Roche Diagnostics, 814407)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
p-Aminobenzoesäure (PABA)	(Sigma Chemie GmbH, A-9879)
Schwefelsäure (95 - 97 %)	(Merck KGaA, 1.00731)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma Chemie GmbH, P-1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KGaA, 1.07209)

3.1.2 Antibiotika und Penicillinase

Amoxicillin	(Sigma Chemie GmbH, A-8523)
Ampicillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, A-9518)
Ampicillin	(Sigma Chemie GmbH, A-9393)
Cefacetril-Natriumsalz	(Novartis, 97120050Z1)
Cefalexin-Hydrat	(Sigma Chemie GmbH, C-4895)
Cefalonium	(Schering-Plough, Bray)

Cefapirin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8270)
Cefazolin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-5020)
Cefoperazon-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-4292)
Ceftiofur-Natriumsalz	(Pharmacia/Upjohn)
Cefquinom-Sulfat	(Intervet Innovation GmbH)
Cloxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-9393)
Dicloxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, D-9016)
Nafcillin-Natriumsalz-Monohydrat	(Sigma Chemie GmbH, N-3269)
Oxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, O-1002)
Penicillin G-Natriumsalz (Benzylpenicillin)	(Sigma Chemie GmbH, PEN-NA)
Streptomycin-Sulfat	(Sigma Chemie GmbH, S-6501)
Tetracyclin	(Sigma Chemie GmbH, T-3258)
Penicillinase (Penase), 10.000.000 IU/ml	(Difco Laboratories, 234610)

3.1.3 Puffer und Lösungen

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

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

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

0,21 mol/l Citratpuffer (mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂, pH 3,9)

1 mol/l Natronlauge (NaOH)

0,01 mol/l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2: 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mmol/l Natriumchlorid)

1 mol/l Schwefelsäure

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

20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

Tetramethylbenzidinlösung:

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

Waschlösung:

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

3.1.4 Immunreagenzien

Die in den Enzymimmuntests (Enzyme immunoassay, EIA) verwendeten Antiseren sowie die Antigen-Enzym-Konjugate wurden zum Teil im Rahmen früherer Untersuchungen am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München von folgenden Autoren entwickelt und für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen:

gruppenspezifisches Antiserum gegen Penicilline (Immunogen: Ampicillin-Bovines Serumalbumin (BSA)), nach Ammoniumsulfatfällung (STRASSER et al., 2003)

Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure, BPO):

Antiserum gegen den Penicillin G-Metaboliten „Anti-BPO“ (Immunogen: Benzylpenicilloyl-BSA), nach Ammoniumsulfatfällung (LITZ, 1995)

Penicillin G-Meerrettichperoxidase-Enzymkonjugat, gekoppelt mittels Carbodiimid (LITZ, 1995)

Enzymimmuntest zum Nachweis von Isoxazolympenicillinen (Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin):

Cloxacillin-Glukose-Oxidase = Beschichtungsantigen (DIETRICH et al., 1996)

Monoklonale Antikörper gegen Isoxazolympenicilline (Immunogen: Cloxacillin-Humanes Serumalbumin (HSA)) (DIETRICH et al., 1996)

Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase (DAKO A/S, P0161)

Enzymimmuntest zum Nachweis von Streptomycin:

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Sigma Chemie GmbH, R-2004)

Antiserum gegen Streptomycin (Immunogen: Streptomycin-Hydrazon-BSA) (SCHNAPPINGER et al., 1993)

Streptomycin-Meerrettichperoxidase-Enzymkonjugat gekoppelt mittels Natriumperjodat (SCHNAPPINGER et al., 1993)

Enzymimmuntest zum Nachweis von Tetracyclin:

Tetracyclin- β -Casein = Beschichtungsantigen (LANG et al., 1992)

Antiserum gegen Tetracyclin (Immunogen: Tetracyclin-BSA) (LANG et al., 1992)

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP (DAKO A/S, P 0217)

Enzymimmuntest zum Nachweis von Ampicillin:

Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase (DAKO A/S, P0161)

Antiserum gegen Ampicillin (Immunogen: Ampicillin-KLH) (DIETRICH et al. 1998)

Ampicillin-Meerrettichperoxidase-Enzymkonjugat gekoppelt mittels Carbodiimid (DIETRICH et al., 1998)

Die Spezifität der jeweiligen Antiseren bzw. Antikörper gegen Cloxacillin, Tetracyclin und Ampicillin, die durch den Einsatz strukturverwandter Substanzen in die Testsysteme überprüft worden war, ist in den Tabellen 3.1 - 3.3 aufgeführt. Die Nachweisgrenzen dieser Enzymimmuntests (Wirkstoff in Pufferlösung) liegen für Cloxacillin bei 0,9 ng/ml, für Tetracyclin bei 0,1 ng/ml und für Ampicillin bei 11,7 ng/ml.

Für den hochspezifischen BPO-EIA betrug die relative Kreuzreaktion mit Penicillin 0,67 %, andere getestete β -Lactam-Antibiotika (Ampicillin, Amoxicillin, Oxa-, Cloxa-, Dicloxacillin, Penicillin V und Phenethicillin) zeigten in den eingesetzten Konzentrationen (maximal 1 000 ng/ml) keinen Einfluss auf das Testsystem. Die Nachweisgrenze dieses Enzymimmuntest beträgt 0,4 ng BPO/ml (LITZ, 1995).

Das ebenfalls hochspezifische Testsystem für den Nachweis von Streptomycin wies lediglich mit dem strukturähnlichen Dihydrostreptomycin eine messbare Kreuzreaktion von 148 % auf. Die Nachweisgrenze dieses Enzymimmuntest liegt bei 0,6 ng Streptomycin/ml (SCHNAPPINGER et al., 1993).

Tabelle 3.1: Relative Kreuzreaktion des Antikörpers gegen Cloxacillin mit anderen Penicillinen (DIETRICH et al., 1996)

Substanz	Molekulargewicht	Relative Kreuzreaktion (%)
Cloxacillin	475,9	100
Dicloxacillin	510,3	330
Oxacillin	441,4	11

Alle anderen getesteten β -Lactam-Antibiotika zeigten keine Kreuzreaktion bei Konzentrationen von 10 μ g/ml.

Tabelle 3.2: Relative Kreuzreaktion des Antiserums gegen Tetracyclin mit anderen Tetracyclinderivaten (MÄRTLBAUER, 1993)

Substanz	Molekulargewicht	Relative Kreuzreaktion (%)
Tetracyclin	444,4	100,00
Chlortetracyclin	478,9	100,73
Rolitetracyclin	527,3	109,76
Minocyclin	457,5	126,83
Demeclocyclin	464,8	37,14
Oxytetracyclin	460,4	4,28
Doxycyclin	444,4	4,58

Tabelle 3.3: Relative Kreuzreaktion des Antiserums gegen Ampicillin (DIETRICH et al., 1998)

Substanz	Molekulargewicht	Relative Kreuzreaktion (%)
Ampicillin	348,4	100
Amoxicillin	365,4	187
Penicillin G	333,4	31
Cloxacillin	435,9	30
Dicloxacillin	470,3	44
Oxacillin	401,4	14

3.1.5 Probenmaterial

3.1.5.1 Kuhmilch

Im Zeitraum von Oktober 2001 bis Dezember 2005 durchliefen insgesamt 79 Kuhmilchproben (Sammelmilch- und Einzelgemelksproben) das integrierte Nachweissystem für Penicillin-Rückstände. Bei den untersuchten Proben handelte es sich zumeist um Anlieferungsmilch, die im Rahmen der Milchgüterverordnung untersucht und im mikrobiologischen Hemmstofftest positiv getestet wurde. Diese Milchproben stammten aus der Untersuchungstätigkeit des Hessischen Verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfung in der Tierzucht e.V. (HVL). Zusätzlich wurden einige von Landwirten eingesandte Einzelgemelksproben untersucht, meist ebenfalls nach Problemen des Betriebes mit positiven Hemmstofftestergebnissen. Als Negativ- und Positiv-Kontrollen (künstlich kontaminiert mit dem jeweiligen Antibiotikum) wurde pasteurisierte, homogenisierte Vollmilch aus dem Handel (Fettgehalt 3,8 %) verwendet.

3.1.5.2 Ziegenmilch

Im Zeitraum von Oktober 2001 bis Mai 2002 wurden insgesamt 577 Ziegenmilchproben (Einzelgemelksproben) aus 13 mittel- und nordhessischen Betrieben untersucht. Diese Betriebe, etwa 50 % aller bekannten Milchziegenhalter Hessens, stellen mit 3 bis 106 laktierenden Ziegen einen repräsentativen Querschnitt dar (Daten zur allgemeinen Betriebsstruktur siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Angaben zur Betriebsstruktur der beprobten Ziegenbestände

Bestand	Herdengröße/ laktierende Ziegen	Rassen	Betriebs- form	MLP	Melk- technik	Fütterung
A	40/5; 21*	BDE	konv.	ja	maschinell, Melkstand	Weide, Heu, Stroh, Getreide, eingeweicht; Propylenglycol
B	12/7	BDE	ökol. (E)	ja	maschinell, Melkpodest	Weide, Gräsermischung, Rotklee, Kraftfutter, Rüben
C	5/3;3*	BDE	konv.	ja	per Hand, im Stall	Weide, Schnitzel, Gerste, Heu, gequetschter Hafer
D	120/39; 48*	BDE, WDE, TOG	konv.	ja	maschinell, Melkstand	Weizen, Gerste, Heu, Schnitzel, Milchvieh- und Mineralfutter
E	16/11	THW	ökol. (D)	2 Ziegen	per Hand, Melkpodest	Grünfutter, Schrot
F	30/26; 21; 27*	BDE, WDE, TOG, THW	ökol. (B)	nein	maschinell, Melkstand	Heu, Weide, Mineralfutter, Getreide
G	66/51	BDE, WDE, THW, SAA	ökol. (E)	ja	maschinell, Melkstand	Gras, Heu, Biertreber, Getreideausputz, Äpfel, Gemüsereste, Kartoffeln
H	189/70; 106*	BDE, WDE, TOG	ökol. (B)	zeitweise	maschinell, Melkstand	Heu, Weide, Klee gras, Grassilage, Kraftfutter, Rüben, Milchleistungsfutter
I	35/15	BDE	konv.	ja	maschinell, Melkstand	Heu, Grünfutter, Hafer, Schnitzel, Gerste, Schaf- mineral
K	22/7	BDE	konv.	2 Ziegen	per Hand, im Stall	Heu, Gras, Schnitzel
L	18/11	BDE, WDE	konv.	ja	per Hand, im Stall	Grünfutter "taunass", Getreidemischung
M	11/4	WDE	konv.	ja	maschinell, im Stall	Gras, Silage, Treber, Hafer, Schrot, Kraftfutter
O	78/31; 16*	BDE	ökol. (D)	ja	maschinell, Melkstand	Heu, Grünfutter, Kraft- und Mineralfutter, Rüben

(MLP - Milchleistungsprüfung; BDE - Bunte Deutsche Edelziege; WDE - Weiße Deutsche Edelziege; TOG - Toggenburger Ziege; THW - Thüringer Waldziege; SAA - Schweizer Saanenziege; konv. - konventionell; ökol. - ökologisch; D – Demeter; B – Bioland; E - nach eigenen Angaben, keinem Verband angeschlossen; * - zwei- bzw. dreimalige Probennahme)

3.1.6 Kommerzielle Hemmstofftestsysteme

BRT-Hemmstofftest	(AiM, Analytik in Milch GmbH)
beta-s.t.a.r.25 und beta-s.t.a.r.100	(Chr. Hansen GmbH, 600897)
SNAP [®] Beta-laktam Test	(IDEXX GmbH, 06-01916-04)

3.1.7 Geräte

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH)
Heizbad GFL	(MAGV GmbH, Laborbedarf/-geräte)
Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic GmbH & Co. KG)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Multi-Blok [®] Heater 20501 IDCE	(Lab Line Instruments)
pH-Meter inolab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Corporation)
Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Sartorius Waage Basic plus	(Sartorius AG)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Variable 12-Kanalpipette 10-100 µl, 30-300 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Zentrifuge Sepatech Varifuge RF	(Heraeus-Christ GmbH)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH)

3.1.8 Sonstige Materialien

Enzymimmuntests:

Mikrotiterplatten ImmunoPlate MaxiSorb	(Nunc GmbH, 439454)
Dialysierschläuche 6 mm Durchmesser	(SERVA Electrophoresis GmbH, 44139)

Datenverarbeitung:

Ridawin Software (Version 1.38)

(R-Biopharm AG)

3.2 Methoden

Zur Untersuchung der Kuhmilchproben wurde ein integriertes Nachweissystem verwendet, das auf Rezeptorbindungstests, einem mikrobiologischen Hemmstofftest und mehreren Enzymimmuntests (Enzyme immunoassay, EIA) basiert. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei, wie auch bei der Untersuchung der Ziegenmilchproben, auf den Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten. Im folgenden wird zunächst die Etablierung der Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten sowie die Durchführung der weiteren verwendeten Enzymimmuntests, des mikrobiologischen Hemmstofftests und der Rezeptorbindungstests beschrieben, anschließend die Untersuchung der Kuhmilchproben mit dem integrierten Nachweissystem und die Untersuchung der Ziegenmilchproben auf Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten.

3.2.1 Etablierung und Durchführung der Nachweisverfahren**3.2.1.1 Enzymimmunologische Nachweise****3.2.1.1.1 Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen**

Zur Erfassung der Penicilline wurde das von STRASSER et al. (2003) beschriebene Antiserum verwendet. Außerdem wurde ein Ampicillin-Konjugat in Anlehnung an die von LITZ (1995) beschriebene Kopplungsmethode hergestellt.

3.2.1.1.1.1 Herstellung und Überprüfung des Ampicillin-Enzym-Konjugates

Ampicillin wurde mittels Carbodiimid-Methode mit Meerrettichperoxidase markiert (LITZ, 1995). Bei dieser einstufigen Reaktion entsteht an der Carboxylgruppe des Thiazolidin-Ringes der β -Laktam-Antibiotika durch das im Überschuss zugegebene Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid) ein O-Acylisoharnstoff, der mit freien Aminogruppen des Enzyms unter Bildung eines Amids und eines Harnstoffderivates reagiert (GOODFRIEND et al., 1964; WONG, 1993).

Hierzu wurden 20 mg Ampicillin und 11 mg Carbodiimid jeweils in 5,0 bzw. 0,5 ml A. dest. gelöst und zu wässriger Meerrettichperoxidase-Lösung (23 mg HRP/1,5 ml A. dest.) gegeben. Das molare Verhältnis von Antibiotikum zu Protein betrug 100:1. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde das Kopplungsprodukt gegen PBS dialysiert (3 x 5 l). Anschließend wurde das Konjugat portioniert und bei -18 °C aufbewahrt. Die Quantifizierung des Gehaltes an Meerrettichperoxidase in der Enzym-Konjugatlösung erfolgte photometrisch anhand einer für Meerrettichperoxidase erstellten Eichkurve, die durch Messung der Extinktion in einem Konzentrationsbereich von 0,05 – 1 ng/ml PBS bei 403 nm erstellt wurde.

Zur Optimierung des EIA wurden anschließend die geeigneten Kombinationen der verschiedenen Konjugat- und Antiserumverdünnungen mittels doppelter Schachbrett-Hemmtitration (Abbildung 3.1) ermittelt. Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit dem gruppenspezifischen Antiserum gegen Penicilline in vier verschiedenen Verdünnungen (1:1000, 1:2000, 1:3000 und 1:4000 in Bicarbonatpuffer) beschichtet (jeweils 100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Ausschlagen der Platte wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min bei RT abgesättigt. Zum Entfernen nicht gebundener Reagenzien wurde die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen und trockengeschlagen. In die Kavitäten der linken Plattenhälfte wurde 10 % Magermilch/A. dest. und in die Kavitäten der rechten Plattenhälfte 25 ng Penicillin G/ml 10 % Magermilch/A. dest. pipettiert (50 µl/Kavität). Das Konjugat wurde in drei verschiedenen Verdünnungen (1:800, 1:1000 und 1:2000 in 1 % Casein/PBS, 50 µl/Kavität) auf die Platte pipettiert. Nach zweistündiger lichtgeschützter Inkubation bei RT wurde die Platte erneut gewaschen und trockengeschlagen. Danach wurden pro Kavität 100 µl Enzymsubstrat/Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Auswertung des Tests erfolgte mittels Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm (ELISA-Auto-Reader, Software RIDAWIN). Für die weiteren Versuche wurden diejenigen Antiserum- und Konjugatverdünnungen ausgewählt, die im antibiotikafreien Ansatz Extinktionen von 0,8 - 1,2 Einheiten ergaben und den größten Extinktionsunterschied (B/B_0) zwischen antibiotikafreiem (B_0) und antibiotikahaltigem (B) Ansatz aufwiesen.

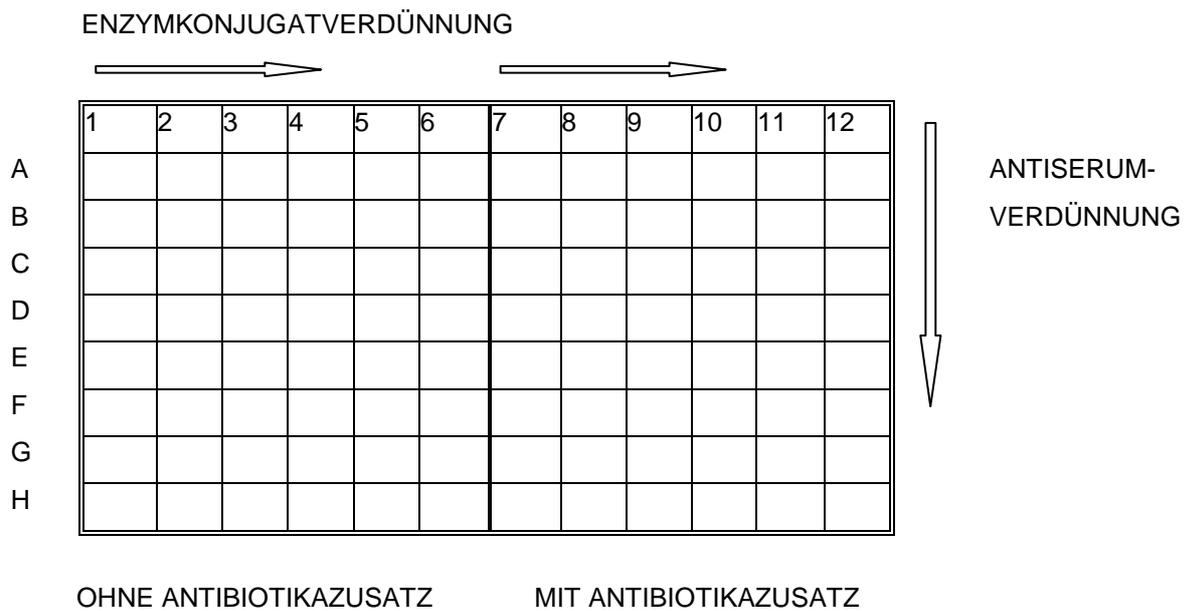


Abbildung 3.1: Plattenbelegung („Schachbrett-Tritration“) zur Ermittlung der optimalen Immunreagenz-Konzentration durch doppelte Austitration von Antiserum gegen Enzymkonjugat ohne (Spalte 1 - 6) bzw. mit einer konstanten Menge Antibiotikum (Spalten 7 - 12)

3.2.1.1.1.2 Durchführung des Enzymimmuntests

Zur Durchführung des direkten kompetitiven Enzymimmuntests wurden Mikrotiterplatten mit dem gruppenspezifischen Antiserum gegen Penicilline (in Bicarbonat-Puffer) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS-Lösung (30 min, RT) wurde die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen und trockengeschlagen. Anschließend wurden jeweils 50 µl Penicillin G-Standards bzw. Proben und 50 µl Ampicillin-Enzymkonjugat (siehe Tabelle 3.5) hinzu gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Reaktionspartner wurde die Platte erneut gewaschen und trockengeschlagen. Danach erfolgte die Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Nach ausreichender Farbentwicklung (10-20 min) wurde die Umsetzungsreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen (ELISA-Auto-Reader, RIDAWIN-Software).

3.2.1.1.3 Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems

Zur Ermittlung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Enzymimmuntests wurden Standardkurven über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ausgewertet. Hierzu wurden jeweils die Testparameter 50%-Inhibitionsdosis (B/B_0) und Nachweisgrenze (NWG) herangezogen. Als NWG wurde jeweils die Konzentration gewertet, deren Extinktion ein Drittel der 50 %-Dosis betrug. Dieser Wert entsprach annähernd der 70 % B/B_0 -Dosis der Standardkurve.

3.2.1.1.4 Überprüfung der Spezifität des Testsystems

Zur Überprüfung der Spezifität des Antiserums wurden Wettbewerbsversuche mit Penicillinen (Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin, Nafcillin) und mit den durch alkalische Hydrolyse erzeugten Derivaten von Penicillin G durchgeführt. Für jede dieser Substanzen wurden Standardkurven in einem Bereich von 0,032 ng/ml bis 100 ng/ml angelegt, die 50%-Inhibitionsdosis bestimmt und unter Berücksichtigung des Molekulargewichts der überprüften Substanzen die relative Kreuzreaktivität nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{50\%-Inhibitionsdosis R (nmol/ml)}}{\text{50\%-Inhibitionsdosis X (nmol/ml)}} \times 100$$

(R = Referenzantibiotikum Penicillin G; X = Testantibiotikum)

Die mit MRL belegten Cephalosporine (Cefapirin, Cefoperazon, Cefazolin, Ceftiofur, Cefalexin, Cefquinom, Cefalonium, Cefacetril) wurden in dem jeweiligen MRL entsprechender Konzentration in das Testsystem eingesetzt.

3.2.1.1.2 Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)

Dieses Testsystem basiert auf polyklonalen Antikörpern gegen hydrolysiertes Penicillin G (Benzylpenicilloylsäure, BPO) und einem Penicillin G-HRP-Konjugat und wird nachfolgend als BPO-EIA bezeichnet. Dieser EIA erwies sich als hochspezifisch für BPO (LITZ, 1995).

3.2.1.1.2.1 Testdurchführung und Auswertung

Zur Herstellung des BPO-Standards wurde 1 mg Penicillin G in 1 ml Methanol gelöst, 20 µl 1 mol/l NaOH hinzugegeben und über Nacht zur Hydrolyse bei RT inkubiert. Mikrotiterplatten wurden mit dem Antiserum gegen BPO, in einer Verdünnung von 1:1000 in Bicarbonat-Puffer, beschichtet (100 µl/Kavität) und ebenfalls über Nacht bei RT inkubiert. Nach Ausschlagen der Platte wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min bei RT abgesättigt. Nach einem Wasch- und Trockenschritt wurden gleichzeitig BPO-Standards bzw. Proben und Penicillin G-Enzymkonjugat (siehe Tabelle 3.5) hinzugegeben (jeweils 50 µl/Kavität) und 2 h lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Nach ausreichender Farbentwicklung (10-20 min) wurde der Substratumsatz mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen (ELISA-Auto-Reader, RIDAWIN-Software).

3.2.1.1.2.2 Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems

Die Ermittlung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des EIA erfolgte wie unter 3.2.1.1.1.3 beschrieben. Zusätzlich wurden im Hinblick auf die Überprüfung der Anwendbarkeit des Verfahrens Standardkurven sowohl in Puffer (PBS) als auch in 5 %- und 2,5 %-iger Magermilch-PBS-Lösung (in PBS rekonstituiertes Magermilchpulver) in einem Konzentrationsbereich von 40 - 0,039 ng/ml angelegt (FLOSS 1997).

3.2.1.1.3 Enzymimmuntest zum Nachweis von Isoxazolympenicillinen (Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin)

Dieser, von DIETRICH et al. (1996) beschriebene indirekte kompetitive EIA basiert auf monoklonalen Antikörpern gegen das Isoxazolympenicillin Cloxacillin, zu deren Herstellung Cloxacillin-HSA als Immunogen diente. Dieser Enzymimmuntest wird nachfolgend als Cloxacillin-EIA bezeichnet. Die Kreuzreaktionen dieses Tests sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

3.2.1.1.3.1 Testdurchführung und Auswertung

Mikrotiterplatten wurden mit Cloxacillin-Glukose-Oxidase (Verdünnung 1:3000 in Bicarbonat-Puffer, siehe Tabelle 3.6) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS-Lösung (30 min, RT) und einem Wasch- und Trockenschritt wurden gleichzeitig Cloxacillin-Standards bzw. Proben und monoklonale Antikörper gegen Isoxazolympenicilline hinzugegeben (jeweils 50 µl/Kavität) und 1 h bei RT inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Reaktionspartner wurde die Platte erneut gewaschen und trockengeschlagen und anschließend Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase hinzugegeben (100 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Nach ausreichender Farbentwicklung (10-20 min) wurde die Umsetzungsreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen (ELISA-Auto-Reader, RIDAWIN-Software).

3.2.1.1.4 Enzymimmuntest zum Nachweis von Streptomycin

Zur Erfassung von Streptomycin wurde der von SCHNAPPINGER et al. (1993) beschriebene kompetitive direkte Enzymimmuntest eingesetzt, der sich aufgrund der hohen Kreuzreaktionen auch für den Nachweis von Dihydrostreptomycin eignet. Bei diesem Testsystem wird die „Double Antibody Solid Phase“-Technik, modifiziert nach ARKAWA et al. (1981), angewandt. Dabei dient ein zweiter, gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper

(Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) als Festkörperphase, an den die spezifischen Antikörper gegen Streptomycin gebunden werden.

3.2.1.1.4.1 Testdurchführung und Auswertung

Zur Durchführung des Enzymimmuntests wurden Mikrotiterplatten mit Anti-Kaninchen-IgG-Serum in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert (siehe Tabelle 3.5). Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Bindungsstellen mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt, anschließend die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und erneut ausgeschlagen. Daraufhin wurde Streptomycin-Standard bzw. Probe (35 µl/Kavität), Streptomycin-Enzym-Konjugat (35 µl/Kavität) und Antiserum (35 µl/Kavität) zugegeben (siehe Tabelle 3.5) und 2 h bei RT inkubiert. Ungebundene Reaktionspartner wurden nachfolgend durch einen Waschschrift entfernt. Nach Zugabe von Substratlösung (100 µl/Kavität) wurde die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.1.1.5 Enzymimmuntest zum Nachweis von Tetracyclin

Dieser, von LANG et al. (1992) entwickelte, indirekte kompetitive EIA basiert auf polyklonalen Antikörpern gegen Tetracyclin und ist aufgrund der beschriebenen Kreuzreaktionen auch zum Nachweis von Chlortetracyclin geeignet (Tabelle 3.2).

3.2.1.1.5.1 Testdurchführung und Auswertung

Mikrotiterplatten wurden mit Tetracyclin-β-Casein (1,6 µg/ml Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer belassen. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 2 % Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) abgesättigt. Im Anschluss an einen Wasch- und Trockenschritt wurden gleichzeitig Tetracyclin-Standards bzw. Proben und das Antiserum gegen Tetracyclin hinzugegeben (jeweils 50 µl/Kavität, siehe Tabelle 3.6) und 1 h bei RT

inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Reaktionspartner wurde die Platte erneut gewaschen und trockengeschlagen und anschließend Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase hinzugegeben (100 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität, siehe Tabelle 3.6). Nach ausreichender Farbentwicklung (10-20 min) wurde die Umsetzungsreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen (ELISA-Auto-Reader, RIDAWIN-Software).

3.2.1.1.6 Enzymimmuntest zum Nachweis von Ampicillin

Bei diesem von DIETRICH et al. (1998) entwickelten direkten kompetitiven Enzymimmuntest, der sich aufgrund der hohen Kreuzreaktionen auch für den Nachweis von Amoxicillin eignet, wird ebenfalls die „Double Antibody Solid Phase“-Technik angewandt. Die Kreuzreaktionen dieses Tests sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

3.2.1.1.6.1 Testdurchführung und Auswertung

Zur Durchführung des Enzymimmuntests wurden Mikrotiterplatten mit Anti-Maus-IgG-Serum in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Bindungsstellen mit 2 %-iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt, anschließend die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und erneut ausgeschlagen. Daraufhin wurde das Maus –Serum in die Kavitäten pipettiert und nach einer weiteren Stunde das Ampicillin-HRP-Konjugat und die Standards bzw. Proben zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationsphase wurden ungebundene Reaktionspartner durch einen Waschschrift entfernt. Nach Zugabe von Substratlösung (100 µl/Kavität) wurde die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.1.2 Mikrobiologische Hemmstofftests und Rezeptorschnelltests

3.2.1.2.1 Testdurchführung und Auswertung des mikrobiologischen Testsystems

Die Durchführung des Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Zur Testvorbereitung wurde ein Wasserbad auf $64\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ vorgeheizt. Je Testplatte wurden vier Negativ-Kontrollen (pasteurisierte Konsummilch) sowie vier Positiv-Kontrollen (Negativkontrollmilch mit Zusatz von Penicillin G (4 ng/ml)) mitangesetzt. Weiterhin wurde ebenfalls im Vierfachansatz pasteurisierte Konsummilch mit Zusatz von 2 ng/ml Penicillin G und Penicillinase-behandelte Positivkontrollmilch eingesetzt. Die zu untersuchende Milchprobe wurde in der Regel unverdünnt, in mehreren Verdünnungen und nach Penicillinase-Behandlung (20 $\mu\text{l/ml}$ Probe, 30 min) jeweils im Vierfachansatz pipettiert.

Zur Durchführung des BRT wurde zunächst die Schutzfolie von den benötigten Kavitätenstreifen entfernt und diese in dem zugehörigen Halterahmen befestigt. Anschließend wurden die Milchproben und Kontrollen pipettiert (100 $\mu\text{l/Kavität}$), die Kavitäten mit Klebefolie verschlossen und die Streifen frei schwimmend im Wasserbad inkubiert. Nach $2,5\text{ h} \pm 15\text{ min}$ wurde der Test aus dem Wasserbad entnommen und die Farbentwicklung der Negativkontrolle (gelbe Entfärbung) beurteilt. Die Milch wurde aus den Kavitäten abgeschüttet, mit Aqua dest. vorsichtig nachgespült und die Kavitäten auf einem Papiertuch ausgeklopft. Die Farbentwicklung wurde auf der Unterseite der Kavitäten beurteilt und mit derjenigen der Kontrollansätze verglichen. Die visuelle Auswertung entsprach der in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB beschriebenen Methode L 01.00-11 [Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch. Agar-Diffusionsverfahren mit *B. stearothermophilus* (Brillantschwarz-Reduktionstest)]. Bei negativem Ergebnis weist die Kavität denselben Farbton wie die Negativ-Kontrolle auf (gelb), bei positivem Ergebnis weicht die Kavität in ihrem Farbton von der Negativ-Kontrolle ab. Zusätzlich zur visuellen Auswertung erfolgte zu Dokumentationszwecken eine instrumentelle Auswertung, die mit Hilfe des ELISA-Auto-Readers durchgeführt wurde (Messwellenlänge 450 nm).

3.2.1.2.2 Testdurchführung und Auswertung der Rezeptorschnelltests

Die Durchführung der Schnelltests Beta s.t.a.r. und SNAP-Test erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Testvorbereitung wurde der entsprechende Heizblock auf $47,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ (Beta s.t.a.r.) bzw. $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ (SNAP-Test) vorgeheizt. Die zu untersuchende Milchprobe wurde sowohl unbehandelt als auch nach Behandlung mit Penicillinase (20 $\mu\text{l/ml}$ Probe, 30 min) in die Testsysteme eingesetzt.

Testdurchführung Beta s.t.a.r.

Das im Testkit enthaltene Lyophilisat wurde in 1,35 ml kalten, destilliertem Wasser gelöst und zu je 25 μl -Portionen in Eppendorf-Gefäße pipettiert (Beta s.t.a.r. 100). Beim gebrauchsfertigen Beta s.t.a.r. 25 entfiel die Herstellung dieser Lösung. Anschließend wurden 100 μl (Beta s.t.a.r. 100) bzw. 200 μl (Beta s.t.a.r. 25) der zu untersuchenden Milch in die Reaktionsgefäße bzw. Eppendorf-Gefäße überführt, mittels Vortex gemischt und bei $47,5\text{ °C}$ 3 min im Heizblock inkubiert, danach je ein Teststreifen in die Lösung gegeben und weitere 2 min im Heizblock inkubiert. Abschließend wurde der Teststreifen aus dem Gefäß entnommen und das Ergebnis abgelesen, indem Testbande und Kontrollbande verglichen wurden. Bei negativem Ergebnis ist die Testbande breiter als die Kontrollbande, bei positivem Ergebnis ist die Testbande nicht oder im Vergleich zur Kontrollbande nur sehr schwach ausgebildet. Bei fehlender Ausbildung der Kontrollbande ist das Ergebnis ungültig.

Testdurchführung SNAP-Test

Zur Durchführung des SNAP-Beta-Lactam Tests wurde eine Testeinheit („SNAP-Tester“), eine Pipette und ein Probenröhrchen, das jeweils ein Reagenzkügelchen enthält, verwendet. Der SNAP-Tester wurde in den Heizblock gestellt. Die gründlich gemischte Milchprobe wurde mit der mitgelieferten Pipette bis zur Markierung aufgezogen ($450\text{ }\mu\text{l} \pm 50\text{ }\mu\text{l}$), die Probe in das Probenröhrchen pipettiert, zum Auflösen des Reagenzkügelchens gevortext und anschließend im vorgeheizten Heizblock 5 min bei 45 °C inkubiert. Danach wurde der Inhalt des Probenröhrchens in die Testkammer des SNAP-Testers gefüllt. Sobald die Probe, die aufgrund der Kapillarwirkung entlang der Testmembran fließt, das „Aktivierungsauge“ passiert, wurde der Auslöser des SNAP-Testers kräftig gedrückt. Nach weiteren 4 min Inkubationszeit wurde der SNAP-Tester aus dem Heizblock genommen und das Ergebnis visuell abgelesen. Bei negativem Ergebnis ist das Probenfeld dunkler als das Kontrollfeld, bei

positivem Ergebnis ist das Probenfeld maximal gleich oder aber weniger intensiv blau gefärbt als das Kontrollfeld. Das Ergebnis ist ungültig, wenn auch im Bereich des Kontrollfelds keine Farbentwicklung des Beschichtungspunktes erkennbar ist.

3.2.2 Untersuchung der Kuhmilchproben mittels integriertem Nachweissystem

3.2.2.1 Probenvorbereitung und künstliche Kontaminierung

Die Kuhmilchproben wiesen bei Probeneingang in der Regel einen gefrorenen Zustand auf. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -18 °C , am Tag der Untersuchung wurden sie im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und im Anschluss der pH-Wert bestimmt.

Zur Herstellung der Positiv-Kontrollen wurde pasteurisierte Konsummilch durch Zugabe von entsprechend verdünnten Standardlösungen mit dem jeweiligen Analyten versetzt (siehe Tabelle 3.5 und 3.6). Im Falle des BPO-EIAs wurde zusätzlich mit Penicillin G dotierte und mit Penicillinase behandelte Milch als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

Mikrobiologische Hemmstofftests und Rezeptorschnelltests

Für den Einsatz im Rezeptorschnelltest wurde ein Teil der zu untersuchenden Milchprobe mit Penicillinase ($20\text{ }\mu\text{l/ml}$ Probe) behandelt und anschließend sowohl die unbehandelte als auch die mit Penicillinase behandelte Milch mittels Rezeptorschnelltest untersucht.

Für die Untersuchung mittels mikrobiologischem Hemmstofftest wurde ebenfalls eine unbehandelte und eine mit Penicillinase vorbehandelte Teilmilchprobe benötigt. Diese wurden unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen in den Test eingesetzt. Falls erforderlich wurde außerdem ein Teil der zu untersuchenden Probe zum Ausschluss von hitzelabilen originären Hemmstoffen 10 min bei 80 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend in das Testsystem eingesetzt (GRIFFITHS, 1986). Bei Verdacht auf Anwesenheit von Sulfonamiden in der Milchprobe wurden 1 ml der Probe mit $100\text{ }\mu\text{l}$ einer wässrigen PABA-Lösung ($2,5\text{ mg/ml}$) versetzt, gründlich durchmischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Proben, die nach Zusatz von PABA keine deutlich herabgesetzte Hemmung des Testkeims im BRT hervorriefen, wurden als sulfonamidhaltig eingestuft (SUHREN und HEESCHEN, 1996).

Enzymimmunologische Nachweise

Vor dem Einsatz in die enzymimmunologischen Nachweissysteme wurde die Milch durch Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min) entfettet. Die Proben wurden je nach Testsystem und gegebenenfalls vorliegendem Vorbericht bzw. Ergebnis einer Voruntersuchung in verschiedenen hohen Verdünnungen im Vierfachansatz in den jeweiligen EIA eingesetzt (siehe Tabelle 3.5 und 3.6). Zur Identifizierung von β -Lactam-Antibiotika wurde im Bedarfsfall in einem Parallelansatz ein Teil der Milchprobe mit Penicillinase inkubiert und anschließend im Testsystem eingesetzt.

Tabelle 3.5: Reagenzien und Reaktionsbedingungen der direkten Enzymimmuntests

Nachweisverfahren	Penicillin-EIA	BPO-EIA	Streptomycin-EIA
Antiserum	gruppenspezifisches Penicillin-Antiserum	BPO-Antiserum	Streptomycin-Antiserum
Verdünnung	1:1 000	1:1 000	1:10 000
in	Bicarbonatpuffer	Bicarbonatpuffer	PBS
Enzymkonjugat	Ampicillin-Meerrettichperoxidase	Pen G-Meerrettichperoxidase	Streptomycin-Meerrettichperoxidase
Verdünnung	1:1 500	1:15 000	1:40 000
in	1 % Casein-PBS-Lösung	1 % Casein-PBS-Lösung	1 % Tween 20/PBS
Standard-Stammlösung	1 mg Penicillin G/ml PBS	1 mg BPO/ml Methanol (siehe 3.2.1.1.2.1)	1 mg Streptomycin/ml PBS
Verdünnung in	10 % Magermilch/A. dest	2,5 % Magermilch/PBS	PBS
Konzentrationsbereich	0,032 ng/ml –100 ng/ml	0,039 ng/ml –40 ng/ml	0,048 ng/ml –50 ng/ml
Antigenfreie Lösung (Leerwert)	10 % Magermilch/A. dest	2,5 % Magermilch/PBS	PBS
Aufbereitung von Milchproben	Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min)	Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min)	Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min)
Verdünnung	1:3, 1:9, 1:27 in 10 % Magermilch/A. dest	1:2, 1:4 in PBS	1:3, 1:9, 1:27 in PBS
Penase-Behandlung	20 µl/ml Probe, 30 min	20 µl/ml Probe, 30 min	entfällt
Verdünnung	1:3, 1:9, 1:27 in 10 % Magermilch/A. dest.	1:2, 1:4 in PBS	
Künstliche Kontamination (Positivkontrollen)	2-8 ng Penicillin G/ml pasteurisierte Milch	15-20 ng BPO/ml pasteurisierte Milch, Penase-Behandlung	10-50 ng Streptomycin/ml pasteurisierte Milch

Tabelle 3.6: Reagenzien und Reaktionsbedingungen der indirekten Enzymimmuntests

Nachweisverfahren	Cloxacillin-EIA	Tetracyclin-EIA
Beschichtung	Cloxacillin-Glukoseoxidase	Tetracyclin- β -Casein
Verdünnung/Konzentration in	1:3 000 Bicarbonatpuffer	1,6 μ g/ml (2:125) Bicarbonatpuffer
Antikörper/Antiserum	Monoklonale Antikörper gegen Cloxacillin	Tetracyclin-Antiserum
Verdünnung/Konzentration in	40 ng/ml 1 % Casein/PBS	1:500 1 % Casein/PBS
Enzym-Konjugat	Kaninchen-Anti-Maus-IgG- Meerrettichperoxidase	Schwein-Anti-Kaninchen-IgG- Meerrettichperoxidase
Verdünnung in	1:5 000 1 % Casein/PBS	1:3 000 1 % Casein/PBS
Standard-Stammlösung	1 mg Cloxacillin/ml PBS	1 mg Tetracyclin/ml PBS
Verdünnung in	12 % Magermilch/Aqua dest.	PBS
Konzentrationsbereich	60 ng/ml – 0,247 ng/ml	5,0 ng/ml- 0,021 ng/ml
Antigenfreie Lösung (Leerwert)	12 % Magermilch/Aqua dest.	PBS
Aufbereitung von Milchproben	Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min)	Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min)
Verdünnung	1:3, 1:9, 1:27 in 12 % Magermilch/Aqua dest.	1:30, 1:60, 1:120 in PBS
Penase-Behandlung	200 μ l/ml Probe, 30 min	entfällt
Verdünnung	1:3, 1:9, 1:27 in 12 % Magermilch/ Aqua dest.	
Künstliche Kontamination (Positivkontrollen)	30 ng Cloxacillin/ml pasteurisierte Milch	50 mg Tetracyclin/ml pasteurisierte Milch

3.2.2.2 Durchführung der Untersuchungen von Kuhmilch auf Penicillin-Rückstände

Das integrierte Nachweissystem wurde jeweils stufenweise durchgeführt (Abbildung 3.2): Der erste Untersuchungsschritt bestand aus der Nachuntersuchung der vorherichtlich hemmstoffpositiven Anlieferungsmilch mittels mikrobiologischem Hemmstofftest (BRT). Bei positivem Ergebnis war hier bereits ein Abschätzen der Wirkstoffkonzentration über die Proben-Verdünnungsreihe möglich. Zusätzlich wurde die mit Penicillinase behandelte Milch mittels BRT untersucht. Zeigte der BRT im Falle der Penicillinase -behandelten Probe ein positives Ergebnis an, wurde davon ausgegangen, dass es sich entweder um ein falsch positives Ergebnis handelte (unspezifische Hemmreaktion) oder, und dies mit wesentlich höherer Wahrscheinlichkeit, dass dieses Resultat durch ein penasestabiles β -Lactam-Antibiotikum oder ein nicht zu der Gruppe der β -Lactame zugehöriges Antibiotikum (evtl. zusätzlich zu vorhandenen β -Lactam-Antibiotika) verursacht wurde.

Als nächster Untersuchungsschritt wurden die beiden Rezeptorschnelltests für β -Lactam-Antibiotika (β beta s.t.a.r. und SNAP-Test) zur Bestätigung der Resultate durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Testsysteme für die verschiedenen Antibiotika konnten hier bei unterschiedlichen Ergebnissen Rückschlüsse auf das auslösende Agens gezogen werden. Zusätzlich lieferte die Untersuchung der mit Penase behandelten Probe weitere Hinweise auf das mögliche Vorkommen von penasestabilen β -Lactam-Antibiotika.

Wurde das Vorhandensein von β -Lactam-Antibiotika mittels der genannten Untersuchungsschritte bestätigt, wurden anschließend die EIA zur Identifizierung und Quantifizierung der fraglichen β -Lactame durchgeführt. Konnten β -Lactam-Antibiotika als Ursache für den hemmstoffpositiven Befund ausgeschlossen werden, wurden andere Enzymimmuntests, wie z. B. der EIA für Tetracycline oder Streptomycin durchgeführt.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der β -Lactame (Abbildung 3.3) wurde die Milchprobe zunächst mittels des Penicillin- EIA untersucht. Zeigte sich hier ein positives Resultat, jedoch ein negatives Resultat nach Penicillinase -Behandlung der Probe, konnte nun mit Hilfe des BPO- EIAs die Anwesenheit von Penicillin G bestätigt werden bzw. mit Hilfe des EIA für Ampicillin und Amoxicillin die Anwesenheit dieser β -Lactame. Die jeweilige

Wirkstoffkonzentration errechnete sich anhand der Standardkurven der EIAs. Erwies sich die Penicillinase -behandelte Probe im Penicillin-EIA allerdings als positiv, wurde im folgenden der Cloxacillin-EIA durchgeführt, um eventuell vorhandene Isoxazolympenicilline zu identifizieren und quantifizieren.

Proben, die im BRT und in den Rezeptorschnelltests positive, im Penicillin-EIA allerdings negative Ergebnisse ergaben, wurden als „cephalosporinhaltig“ eingruppiert. Zur Feindifferenzierung dieser Gruppe wurden zeitgleich mit dieser Arbeit weitere Testsysteme entwickelt (THAL, 2006; MEIER, 2008).

Tabelle 3.7: Analysensystem zur Differenzierung von β -Laktam-Rückständen in Milch

	Enzymimmunologisches Testsystem						
	Penicilline gruppen- spezifisch	Isoxazolyl Penicilline	Ampicillin/ Amoxicillin	Penicillin G Metabolit	Ceftiofur	Cefquinom	Cefalexin
Penicillin G	+	-	-	(+)*	-	-	-
Penicillin V	+	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	+	-	+/-	-	-	-	-
Amoxicillin	+	-	+/-	-	-	-	-
Oxacillin	+	+	-	-	-	-	-
Cloxacillin	+	+	-	-	-	-	-
Dicloxa- cillin	+	+	-	-	-	-	-
Nafcillin	+	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	-	-	-	-	+	-	-
Cefquinom	-	-	-	-	-	+	-
Cefalexin	-	-	-	-	-	-	+

+ Wirkstoff < MRL oder nahe MRL-Bereich nachweisbar

+/- Wirkstoff nachweisbar im Bereich von 5-10 x MRL

- Wirkstoff nicht nachweisbar

* Wirkstoff nach Penicillinase-Behandlung nachweisbar

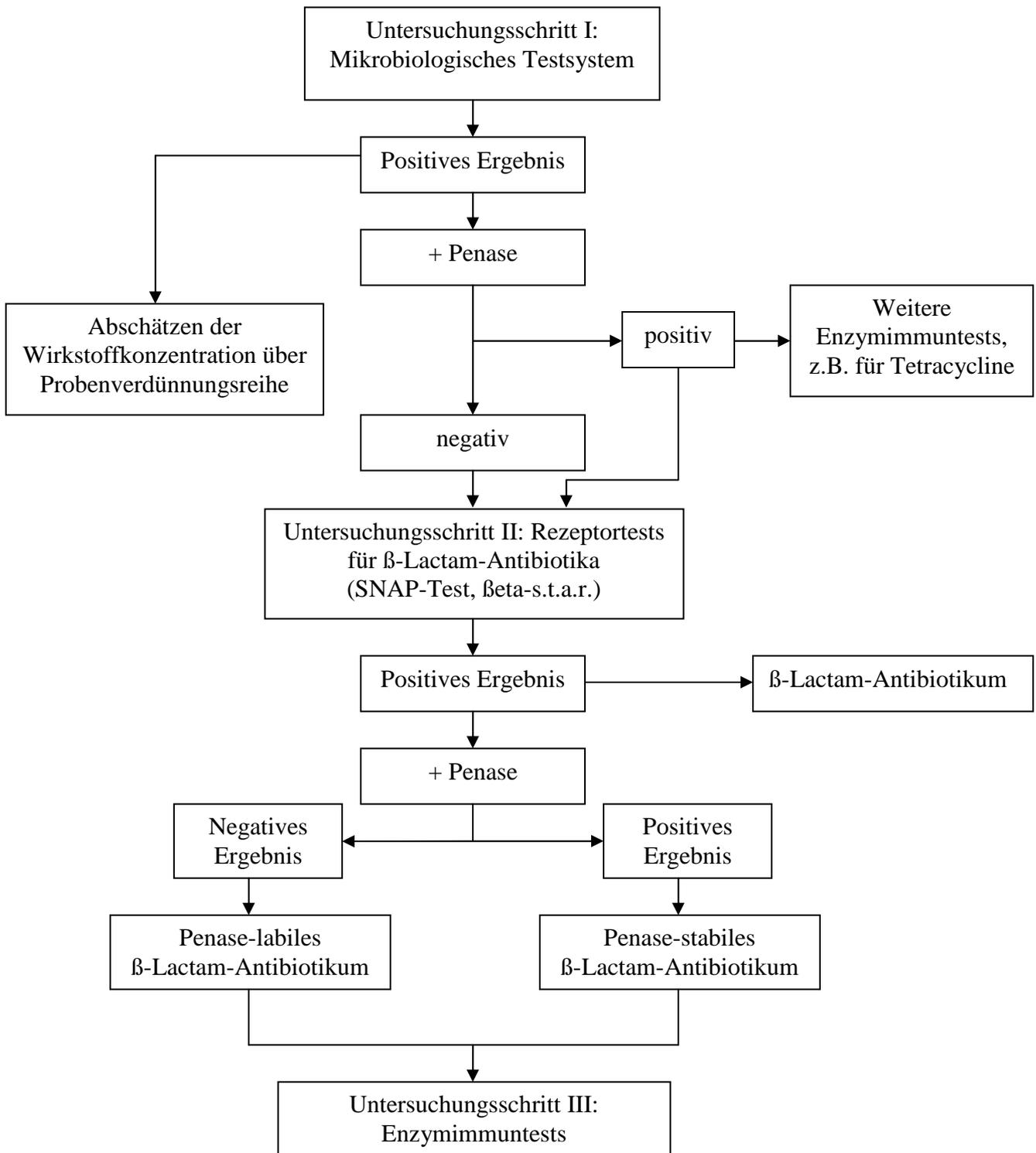


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Durchführung des integrierten Nachweissystems

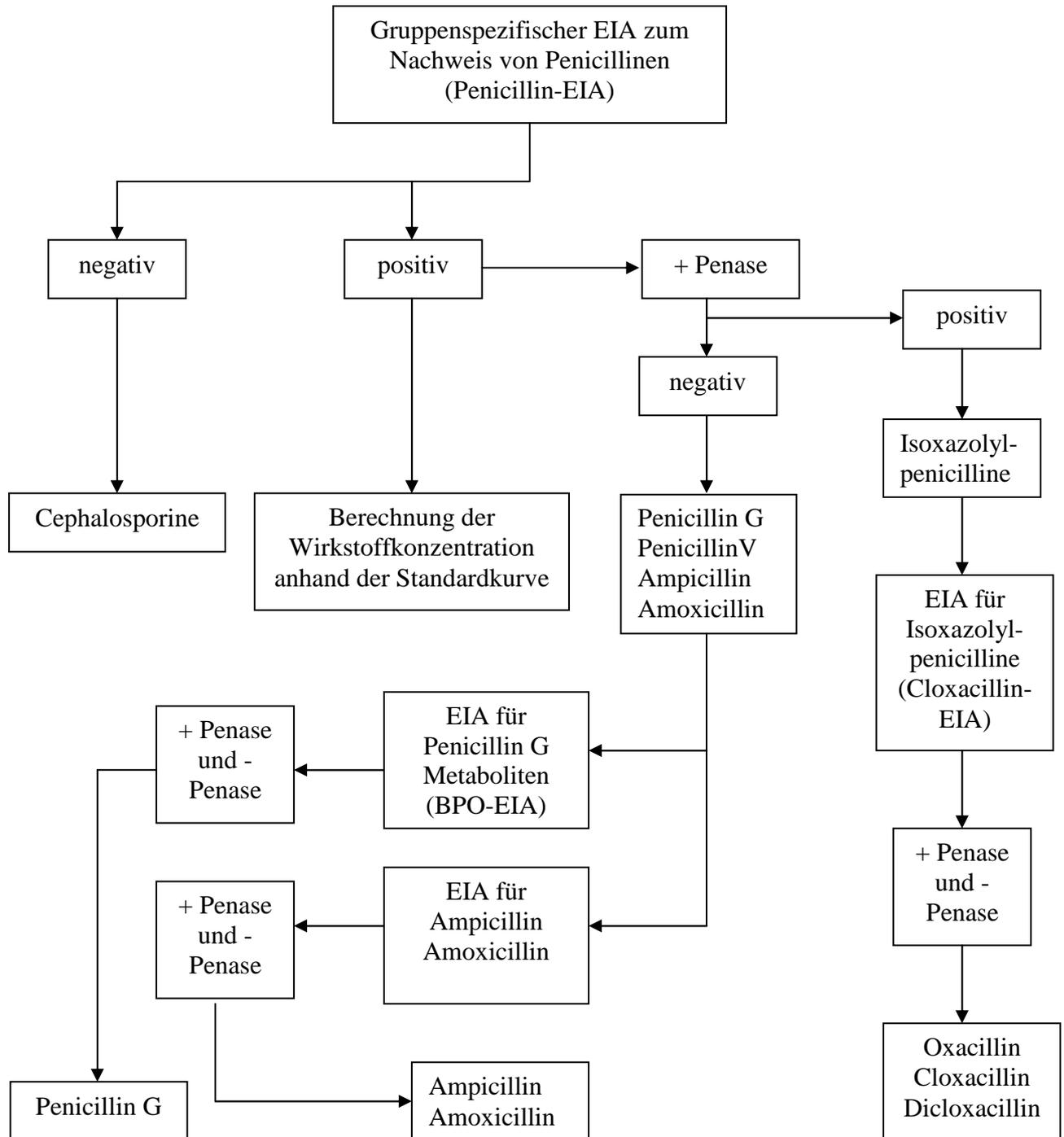


Abbildung 3.3: Typische Testsequenz beim Einsatz der Enzymimmuntests zur Identifizierung und Quantifizierung von β -Lactam-Antibiotika im integrierten Analysensystem

3.2.3 Untersuchung der Ziegenmilchproben

3.2.3.1 Modifikation und Etablierung der enzymimmunchemischen Testsysteme

3.2.3.1.1 Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen

3.2.3.1.1.1 Optimierung der Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch

Orientierende Versuche zum Einfluss der Probenmatrix Ziegenmilch auf das Testsystem wurden mit Ziegenrohmlch durchgeführt. Die Ziegenrohmlch wurde durch Zentrifugieren (1942 x g, 4 °C, 15 min) entfettet und anschließend unverdünnt und verdünnt (1:2 bis 1:16) mit dem EIA untersucht. Zusätzlich wurde entfettete Ziegenmilch mit Penicillin G in verschiedenen Konzentrationen (2 – 32 ng/ml) versetzt und ebenfalls unverdünnt und verdünnt in das Testsystem eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen bei den orientierenden Versuchen zunächst den Angaben aus Tabelle 3.5. Die für diese Proben erhaltenen Extinktionswerte wurden anhand von Standardkurven für Penicillin G ausgewertet.

Zur Optimierung der Empfindlichkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilchproben wurden die antigenfreie Lösung (Leerwert) und die Standardverdünnungsreihe sowohl in Magermilchpulverlösungen (5, 10, 20, 25, 30, 35 % Magermilch/Aqua dest.-Lösung) als auch in Casein/PBS-Lösungen verschiedener Konzentration (0,5, 1, 2 und 5 %-ig) angesetzt, die erhaltenen Standardkurven direkt miteinander verglichen und die Ergebnisse in Bezug zu in diesen Versuchen erhaltenen Probenextinktionswerten gesetzt.

Zur weiteren Erarbeitung geeigneter Probenverdünnungsverfahren wurde entfettete antigenfreie und mit Penicillin G (2 – 32 ng/ml) versetzte Ziegenrohmlch in verschiedenen Verdünnungsmedien (0,5 und 1 % Casein-PBS/Lösung, 20 % Magermilch/Aqua dest.-Lösung) und Verdünnungsstufen (1:2 bis 1:16) in das optimierte Testsystem eingesetzt. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden anhand einer Standardkurve für Penicillin G ausgewertet.

3.2.3.1.1.2 Durchführung des gruppenspezifischen Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillinen

Die Durchführung des Enzymimmuntest erfolgte wie unter 3.2.1.1.1.2 beschrieben. Abweichend von Tabelle 3.5 erfolgte die Verdünnung der Standards und der Proben in den nun optimierten Verdünnungslösungen (siehe 4.3.1.1.1). Auch der Ansatz der antigenfreien Lösung (Leerwert) war optimiert worden.

3.2.3.1.1.3 Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems

Die Ermittlung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des EIA erfolgte wie unter 3.2.1.1.1.3 beschrieben.

3.2.3.1.2. Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)

3.2.3.1.2.1 Optimierung der Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch

Zum Einfluss der Probenmatrix Ziegenmilch auf das Testsystem wurden ebenfalls zunächst orientierende Versuche mit Ziegenrohmilch durchgeführt. Die durch Zentrifugieren entfetteten Proben wurden unverdünnt und verdünnt (1:2 bis 1:8 in PBS bzw. Aqua dest.) untersucht. Zusätzlich wurde entfettete Ziegenmilch mit BPO in verschiedenen Konzentrationen (8 – 16 ng/ml) versetzt und ebenfalls unverdünnt und verdünnt in das Testsystem eingesetzt. Die weiteren Reaktionsbedingungen entsprachen bei den orientierenden Versuchen den Angaben aus Tabelle 3.5. Die für die Proben erhaltenen Extinktionswerte wurden anhand von Standardkurven für BPO ausgewertet.

Im Anschluss an die orientierenden Versuche wurden die antigenfreie Lösung (Leerwert) und die Standardverdünnungsreihe sowohl in verschiedenen Magermilchpulverlösungen (2,5 und 5 % Magermilch-PBS- und 2,5 % Magermilch-Aqua dest.-Lösung) als auch in Verdünnungen von Kuh- und Ziegenmilch in PBS bzw. Aqua dest. angesetzt (12,5 %, 25 % und 50 %

Kuhmilch-PBS-Lösung, 25 % Kuhmilch-Aqua dest.-Lösung, 25 % Ziegenmilch-Aqua dest.-Lösung und 50 % Ziegenmilch-PBS-Lösung) und die erhaltenen Standardkurven direkt miteinander verglichen.

3.2.3.1.2.2 Durchführung des Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)

Die Durchführung des Enzymimmuntest erfolgte wie unter 3.2.1.1.2.1 beschrieben. Die Probenverdünnung wurde entsprechend der optimierten Bedingungen vorgenommen (siehe 4.3.1.2.1).

3.2.3.2 Probengewinnung und -aufbereitung

Die Probennahme erfolgte während der Melkzeiten. Nach dem im jeweiligen Bestand üblichen Vormelken wurden von jeder Ziege etwa 70 ml Milch als Gemisch aus rechter und linker Euterhälfte entnommen. Danach wurden die Ziegen maschinell oder von Hand ausgemolken.

In 6 der 13 Betriebe erfolgte eine zwei- bzw. dreimalige Probennahme in verschiedenen Zeiträumen (Herbst/Frühjahr).

Die Proben wurden nach dem Melken in mit Kühlaggregaten versehenen Isolierboxen transportiert, sobald wie möglich eingefroren und bis zur Untersuchung bei -18 °C gelagert. Zur Untersuchung wurden sie im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut.

3.2.3.3 Durchführung der Untersuchungen

Die Untersuchung der Ziegenmilchproben erfolgte ausschließlich mittels Enzymimmuntests, da der Schwerpunkt dieser Untersuchungen auf der Überprüfung der Anwendbarkeit dieser Testsysteme für die Untersuchung von Ziegenmilch lag. Zusätzlich sollte die Penicillin-Belastung von Ziegenmilch aus hessischen Betrieben überprüft werden.

Die Milchproben wurden zunächst unverdünnt und verdünnt (1:2) mittels Penicillin-EIA untersucht. Zeigte sich hier ein positives Resultat, wurden die Proben erneut sowohl unverdünnt als auch in mehreren Verdünnungen (1:2 bis 1:4) in das Testsystem eingesetzt. Zusätzlich wurden die bei Erstuntersuchung verdächtigen Proben mit 2 ng Penicillin G/ml künstlich kontaminiert. Als Negativ-Kontrolle diente rückstandsfreie Ziegenrohmlch, welche für den Einsatz als Positiv-Kontrolle mit verschiedenen Gehalten an Penicillin G (2 – 64 ng/ml) künstlich kontaminiert wurde.

Zeigte der gruppenspezifische EIA für Penicilline ein positives Ergebnis, so wurde die Ziegenmilchprobe zur Eingrenzung des Befunds im EIA für Penicillin G-Metaboliten untersucht. Hierzu wurde die Probe unverdünnt und nach Penase-Behandlung (20 µl/ml Probe, 30 min) in das Testsystem eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente erneut rückstandsfreie Ziegenrohmlch, welche für den Einsatz als Positiv-Kontrolle mit verschiedenen Gehalten an BPO (4-8 ng/ml) künstlich kontaminiert wurde. Die Wirkstoffkonzentration des jeweiligen Antibiotikum errechnete sich anhand der Standardkurven der EIA.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung der Nachweisverfahren

4.1.1 Enzymimmunologische Nachweise

4.1.1.1 Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin

4.1.1.1.1 Überprüfung des Ampicillin-Enzym-Konjugates

Die Überprüfung des synthetisierten Ampicillin-Enzymkonjugates mittels Schachbrett-Hemmtitration ergab als optimale Verdünnung 1:1500 (Ampicillin-Enzym-Konjugat in 1 % Casein/PBS) bei einer Verdünnung des Antiserums zur Beschichtung von 1:1000. Die photometrische Quantifizierung des Meerrettichperoxidase-Gehaltes in dem Ampicillin-Enzym-Konjugat bei 403 nm ergab eine Konzentration von 1,9 mg HRP/ml. Damit lag die Arbeitskonzentration des Enzymkonjugats bei 1,9 µg/ml, was den Angaben von STRASSER et al. (2003) entsprach.

4.1.1.1.2 Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems

Nach Optimierung des Testsystems durch die Herstellung des Ampicillin-Enzym-Konjugates lag die 50%–Inhibitionsdosis für Penicillin G bei $0,82 \pm 0,27$ ng/ml, die daraus errechnete mittlere Nachweisgrenze lag bei $0,27 \pm 0,09$ ng/ml. Weitere Charakteristika der Standardkurven sind in Tabelle 4.1 angegeben. Zur Veranschaulichung des Messbereiches ist in Abbildung 4.1 eine typische Standardkurve für den Nachweis von Penicillin G im direkten kompetitiven Enzymimmuntest abgebildet.

Tabelle 4.1: Standardkurvenparameter des gruppenspezifischen Enzymimmuntest für Penicillin nach Auswertung von 40 Standardkurven

	50 %-Dosis
Mittelwert (ng/ml)	0,82
Standardabweichung (ng/ml)	0,27
Variationskoeffizient (%)	33,35
Median (ng/ml)	0,72
Minimalwert (ng/ml)	0,45
Maximalwert (ng/ml)	1,60

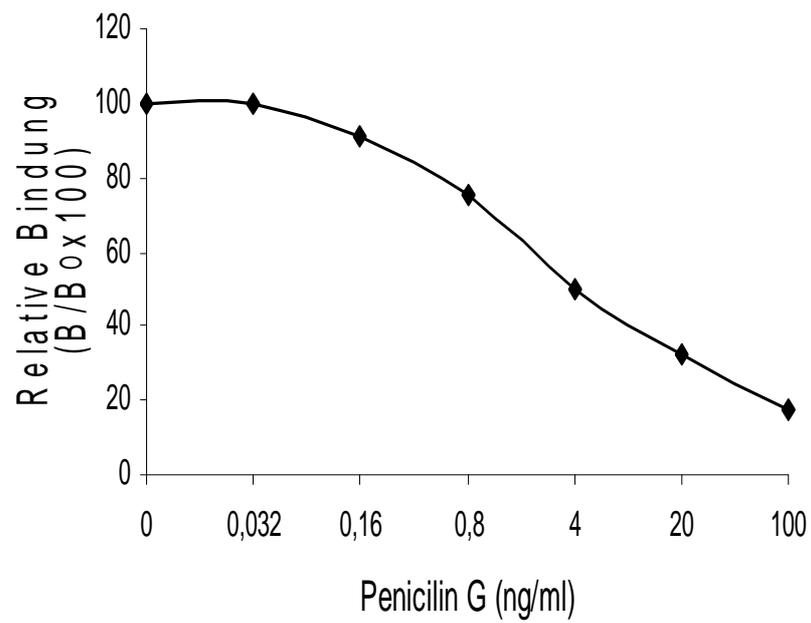


Abbildung 4.1: Typische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillin. Die 50 %-Dosis der Standardkurve lag bei 0,81 ng/ml

4.1.1.1.3 Spezifität des Testsystems

Die zur Bestimmung der Spezifität des Testsystems durchgeführten Wettbewerbsversuche ergaben die in Tabelle 4.2 aufgelisteten Ergebnisse. Die getesteten Cephalosporine, die in der dem jeweiligen MRL entsprechenden Konzentration eingesetzt wurden, konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 4.2: Relative Kreuzreaktionen des gruppenspezifischen Antiserums gegen Penicilline mit relevanten Penicillinen und Penicillin G-Metaboliten

Substanz	Molekulargewicht	Relative Kreuzreaktion (%)
Penicillin G	333,4	100
Ampicillin	348,4	85
Amoxicillin	365,4	29
Oxacillin	441,4	43
Cloxacillin	475,9	25
Dicloxacillin	510,3	26
Nafcillin	454,5	101
BPO	348,4	1,7

4.1.1.2 Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)

4.1.1.2.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems

Die Auswertung der in 2,5 %-iger Magermilch-PBS-Lösung erstellten Standardkurven ergab eine mittlere 50 %-Inhibitionsdosis für BPO von $3,2 \pm 0,7$ ng/ml. Hieraus errechnet sich eine mittlere Nachweisgrenze von ca. 1 ng BPO/ml. Weitere Standardkurvenparameter sind in Tabelle 4.3 angegeben, eine charakteristische Standardkurve zeigt Abbildung 4.2.

Tabelle 4.3: Charakteristika der Standardkurven des Enzymimmuntest zum Nachweis von Benzylpenicilloylsäure nach Auswertung von 50 Standardkurven

	50 %-Dosis
Mittelwert (ng/ml)	3,19
Standardabweichung (ng/ml)	0,70
Variationskoeffizient (%)	21,88
Median (ng/ml)	3,05
Minimalwert (ng/ml)	1,30
Maximalwert (ng/ml)	4,70

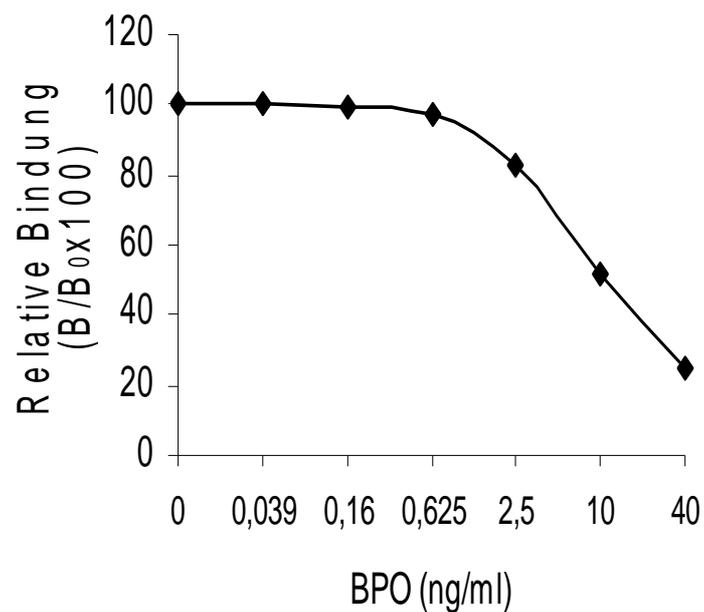


Abbildung 4.2: Charakteristische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Benzylpenicilloylsäure. Die 50 %-Dosis der Standardkurve lag bei 2,7 ng/ml.

4.2 Nachweis von Penicillin-Rückständen in Kuhmilch mittels integriertem Nachweissystem

4.2.1 Nachweis von Penicillin-Rückständen in künstlich kontaminierter Kuhmilch

Die für den gruppenspezifischen Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen ermittelten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die mit Penicillin G künstlich kontaminierten Milchproben wurden in Vierfachansätzen in das Testsystem eingesetzt (3.2.2.1). Die Wiederfindungsraten für Penicillin G lagen im untersuchten Dotierungsbereich zwischen 101,4 und 106,4 %.

Tabelle 4.4: Wiederfindungsraten für Penicillin G in künstlich kontaminierten Milchproben

Penicillin G-Zusatz (ng/ml)	Messergebnisse im Enzymimmuntest für Penicilline				
	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)	Wiederfindung (%)	n
2	2,0	0,5	25,0	101,4	72
4	4,2	0,7	16,7	106,4	76
8	8,3	1,5	17,9	103,3	66

Für den Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten wurden die Wiederfindungsraten in unverdünnter Milch mit denen der in PBS verdünnten Proben verglichen. Die beste Wiederfindung ergab sich bei einer Probenverdünnung von 1:2 in PBS (Tabelle 4.5). Die mit Benzylpenicilloylsäure künstlich kontaminierten Milchproben wurden ebenfalls in Vierfachansätzen in das Testsystem eingesetzt (3.2.2.1).

Tabelle 4.5: Wiederfindungsraten für mittels alkalischer Hydrolyse synthetisierte Benzylpenicilloylsäure (BPO) in künstlich kontaminierten Milchproben (10 ng BPO/ml)

Proben- verdünnung	Messergebnisse im Enzymimmuntest für Penicillin G-Metaboliten (BPO)				
	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)	Wiederfindung (%)	n
unverdünnt	16,8	3,8	22,6	168,2	44
1:2	10,3	1,9	18,7	103,1	44
1:4	4,7	2,0	42,9	45,5	43

In der mit Penicillin G (10 ng/ml) dotierten und mit Penicillinase behandelten Milch, die als zusätzliche Positiv-Kontrolle in den Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten eingesetzt wurde, konnten bei 37 Tests im Mittel 2 ng BPO/ml nachgewiesen werden.

Tabelle 4.6: Wiederfindung von Benzylpenicilloylsäure in mit Penicillin G (10 ng/ml) künstlich kontaminierten und mit Penicillinase behandelten Milchproben (n = 37)

Messergebnisse im Enzymimmuntest für Penicillin G-Metaboliten	
Mittelwert (ng/ml)	2,1
Standardabweichung (ng/ml)	1,0
Variationskoeffizient (%)	48,6
Median (ng/ml)	1,9
Minimalwert (ng/ml)	0,441
Maximalwert (ng/ml)	4,4

4.2.2 Nachweis von Penicillin-Rückständen in hemmstoffpositiver Kuhmilch

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes waren Penicilline die am häufigsten identifizierten Rückstände in hemmstoffpositiver Kuhmilch (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Antibiotikarückstände in hemmstoffpositiven Milchproben (10/2001-12/2005)

Identifizierter Hemmstoff	n	%
Penicillin G ¹	61	77,2
Cephalosporin(e)	8	10,1
Ampicillin/Amoxicillin	4	5,1
Isoxazolympenicillin	2	2,5
Sulfonamid	1	1,3
Keine verursachende Substanz identifiziert	3	3,8
Summe	79	100

¹Eine der Penicillin G-positiven Proben aus 2002 enthielt zusätzlich Nafcillin und (Dihydro-) Streptomycin

Penicillin G wurde in 61 der 79 untersuchten Milchproben identifiziert (77,2 %). Die Höhe der Kontamination lag zumeist im Bereich des ein- bis zweifachen MRL (4 ng/ml). In einzelnen Fällen wurden aber auch Gehalte über 100 ng Penicillin G/ml festgestellt (Tabelle 4.8). In drei der 79 Proben (3,8 %) konnte kein Antibiotikum identifiziert werden, obwohl der mikrobiologische Hemmstofftest (BRT) positiv war. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Einsatz eines untypischen Antibiotika-Präparates oder Desinfektionsmittelrückstände zurückzuführen, eine unspezifische Reaktion des Hemmstofftests kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.8: Höhe der Antibiotika-Belastung in Kuhmilch (10/2001-12/2005)

Untersuchungszeitraum	Identifizierter Hemmstoff (n)	ng/ml			
		MW	Med	Max	Min
10/2001-12/2001	Penicillin G (3)	8,7	10	12	4
01/2002-12/2002	Penicillin G (10)	15,7	10	59	4
	Nafcillin (1)	2-4	2-4	2-4	2-4
	Streptomycin (1)	25-50	25-50	25-50	25-50
	Cephalosporin* (1)	EIA 06/2002 noch in Entwicklung			
01/2003-12/2003	Penicillin G (30)	118,2	8	2000	3
	Ampicillin (2)	9	9	13	5
	Ceftiofur (3)	345	345	400	290
01/2004-12/2004	Penicillin G (5)	17,9	17	36	0,7
	Amoxicillin (1)	15	15	15	15
	Oxacillin (1)	100-200	100-200	100-200	100-200
	Ceftiofur (1)	830- 1530	830- 1530	830- 1530	830- 1530
	Sulfonamide (1)	kein EIA/quantitativer Nachweis			
01/2005-12/2005	Penicillin G (12)	34	5,2	320	1,3
	Amoxicillin (1)	36	36	36	36
	Cloxacillin (1)	70	70	70	70
	Ceftiofur** (2)	368,7	-	373-689	159-254

*Aufgrund der positiven Ergebnisse im Hemmstofftest (BRT) sowie im Schnelltest (SNAP-Beta-Laktam Test) enthielt die Probe ein penicillinaseinstabiles β -lactam-Antibiotikum.

Durch das negative Ergebnis im gruppenspezifischen EIA für Penicilline können diese ausgeschlossen werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich bei dem Hemmstoff um ein Cephalosporin.

** Im Zeitraum 01/2005-12/2005 waren drei der 17 untersuchten Proben mit Cephalosporinen belastet. Bei zwei Proben konnte Ceftiofur identifiziert werden. Probe 5/2005 enthielt aufgrund der positiven Ergebnisse im Hemmstofftest (BRT) sowie in den Schnelltests (SNAP-Beta-Laktam Test und β -s.t.a.r.) ein penicillinaseinstabiles β -Lactam-Antibiotikum. Durch das negative Ergebnis im gruppenspezifischen EIA für Penicilline können diese ausgeschlossen werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich bei dem Hemmstoff um ein Cephalosporin, wobei Ceftiofur (und Metabolit), Cefalexin und Cefquinom aufgrund der für diese Hemmstoffe negativen EIAs ausgeschlossen werden konnten.

Obwohl die Anzahl der pro Jahr untersuchten Proben zu gering ist, um eine eindeutige Aussage zu treffen, stellt sich die Situation über den Untersuchungszeitraum relativ konstant dar (Abbildung 4.3).

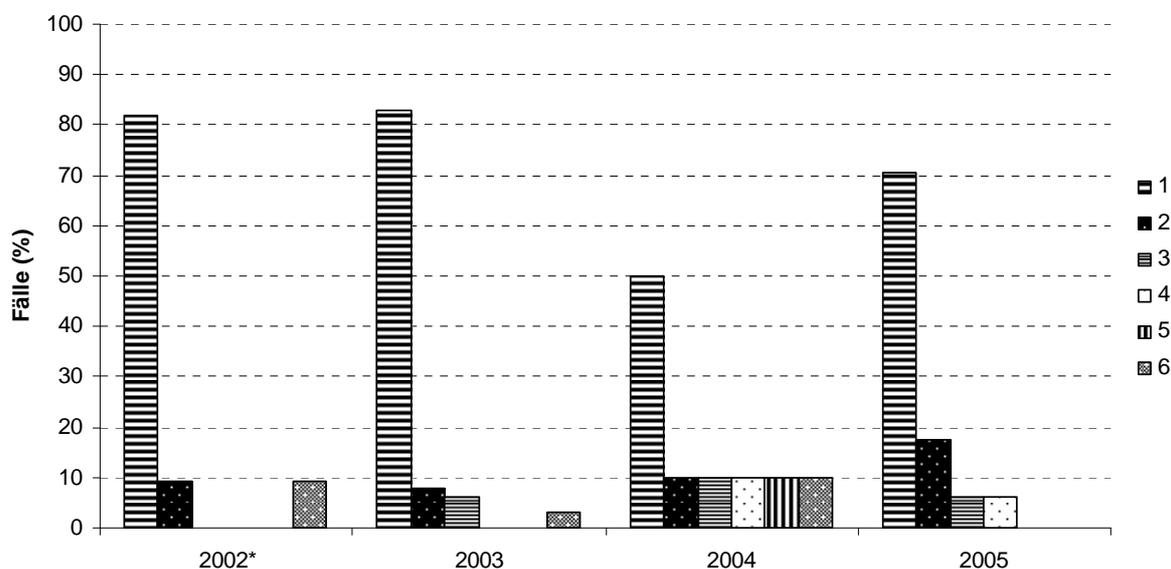


Abbildung 4.3: Vergleich der prozentualen Anteile der in positiven Milchproben identifizierten Hemmstoffe über einen Zeitraum von vier Jahren. 1= Penicillin G, 2 = Cephalosporin, 3 = Ampicillin/Amoxicillin, 4 = Isoxazolympenicillin, 5 = Sulfonamid, 6 = keine verursachende Substanz identifiziert

*Eine der Penicillin G-positiven Proben aus 2002 enthielt zusätzlich Nafcillin und (Dihydro-) Streptomycin

4.3 Nachweis von Penicillin-Rückständen in Ziegenmilch

4.3.1 Modifikation und Etablierung der enzymimmunchemischen Testsysteme

4.3.1.1 Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillinen

4.3.1.1.1 Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch

Die Verdünnungen der Penicillin G-Standardkurven und die antigenfreie Lösung (Leerwert) wurden in 20 %-iger Magermilchlösung angelegt. Die Ziegenmilchproben wurden unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:2 in das Testsystem eingesetzt. Die Verdünnungen der Ziegenmilchproben wurden ebenfalls in 20 %-iger Magermilchlösung angefertigt.

Der quantitative Nachweis von Penicillin G in künstlich kontaminierter Ziegenmilch wurde während des gesamten Untersuchungszeitraumes überprüft. Die ermittelten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 4.9 dargestellt. Künstlich kontaminierte Ziegenmilchproben wurden in Vierfachansätzen in das Testsystem eingesetzt. Die Wiederfindungsraten für Penicillin G lagen im untersuchten Dotierungsbereich (2-32 ng/ml) zwischen 88,6 und 137,5 %.

Tabelle 4.9: Wiederfindungsraten für Penicillin G in künstlich kontaminierten Ziegenmilchproben

Penicillin G-Zusatz (ng/ml)	Messergebnisse im Enzymimmuntest für Penicilline				
	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)	Wiederfindung (%)	n
2	2,8	0,8	28,4	137,5	22
4	4,7	1,2	24,8	117,3	29
8	8,4	2,6	31,3	104,75	10
16	14,2	3,5	24,9	88,6	15
30	29,0	3,0	10,3	96,6	6
32	28,9	10,8	37,4	90,0	7

4.3.1.1.2 Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems

Die Auswertung der in 20 %-iger Magermilch-Aqua dest.-Lösung erstellten Standardkurven ergab eine mittlere 50 %-Dosis von 1,1 ng Penicillin G/ml, woraus sich eine Nachweisgrenze von 0,37 ng Penicillin G/ml errechnete. Weitere Standardkurvenparameter sind in Tabelle 4.10 angegeben, eine typische Standardkurve zeigt Abbildung 4.4.

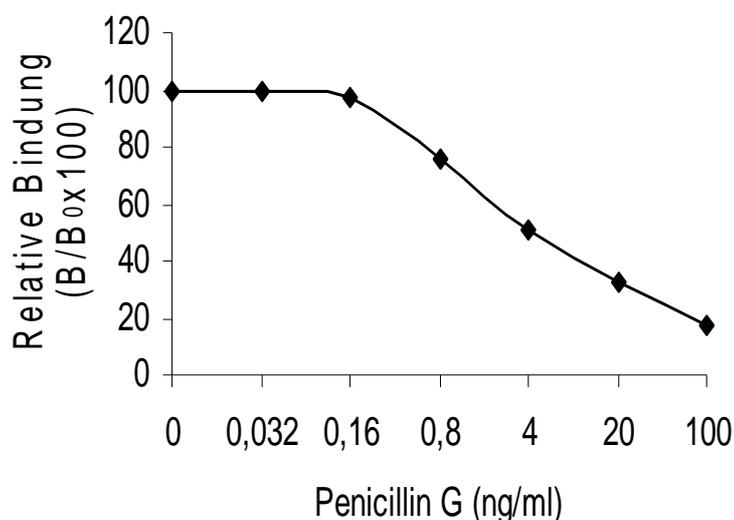


Abbildung 4.4: Charakteristische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum gruppenspezifischen Nachweis von Penicillin. Die 50 %-Dosis der Standardkurve lag bei 1,1 ng/ml.

Tabelle 4.10: Charakteristika der Standardkurven des gruppenspezifischen Enzymimmuntest für Penicilline nach Auswertung von 50 Standardkurven

	50 %-Dosis
Mittelwert (ng/ml)	1,11
Standardabweichung (ng/ml)	0,37
Variationskoeffizient (%)	33,26
Median (ng/ml)	1,10
Minimalwert (ng/ml)	0,33
Maximalwert (ng/ml)	2,00

4.3.1.2 Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)

4.3.1.2.1 Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Ziegenmilch

Die Verdünnungen der Standardkurven und die antigenfreie Lösung (Leerwert) wurden in 2,5 %-iger Magermilch-PBS-Lösung erstellt. Dies entspricht den Bedingungen, unter welchen auch Kuhmilch mit diesem Testsystem untersucht wird. Die Ziegenmilchproben wurden 1:2 in PBS verdünnt in den Enzymimmuntest eingesetzt.

Die für den Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten ermittelten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Die mit BPO künstlich kontaminierten Milchproben wurden in Vierfachansätzen in das Testsystem eingesetzt. Die Wiederfindungsraten für BPO lagen im untersuchten Dotierungsbereich zwischen 95,2 und 123,1 %.

Tabelle 4.11: Wiederfindungsraten für Benzylpenicilloylsäure in künstlich kontaminierten Ziegenmilchproben

BPO-Zusatz (ng/ml)	Messergebnisse im Enzymimmuntest für Penicillin G-Metaboliten				
	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)	Wiederfindung (%)	n
4	4,9	1,0	20,5	123,1	4
8	8,7	2,6	29,7	108,25	5
16	15,2	1,8	12,0	95,2	3

4.3.2 Ergebnisse der Untersuchung von Ziegenmilch auf Penicillin-Rückstände

Von den insgesamt 577 untersuchten Ziegenmilchproben ergaben sich für 9 Proben (1,56 %) mittels Enzymimmuntest Penicillin G-positive Rückstandsbefunde. Der Gehalt an Penicillin G lag bei zwei (0,35 %) Proben über dem MRL (4 ng/ml). In einer dieser Proben (A 12) konnten 7 ng Penicillin G/ml nachgewiesen werden, der Gehalt an BPO betrug 4,6 ng/ml, nach Penicillinase-Behandlung der Probe wurden 5,9 ng BPO/ml gemessen. Der Gehalt an Penicillin G der zweiten Probe (H 105, gelb) lag weit über dem normalen Meßbereich der Standardkurve des Testsystems. Diese Probe musste zur genaueren Untersuchung bis zu

1:64.000 verdünnt werden und ergab hierbei Penicillin G-Gehalte von 60–100 Microgramm je ml, also mehr als das 10.000–fache des MRL.

Zur Kontrolle wurde Hemmstoff-negative Ziegenmilch in ebenso hohen Bereichen mit Penicillin G dotiert. Bei der Untersuchung dieser Probe auf BPO wurden Werte im Bereich von 20.600-45.500 ng/ml gemessen. Nach Penicillinase-Behandlung der Probe stiegen diese Werte auf 29.000-56.000 ng BPO/ml. Auch für diese Untersuchung wurde die Probe bis zu 1:64.000 verdünnt in das Testsystem eingesetzt. Einen Überblick über die Gesamtheit der mit Penicillin G kontaminierten Proben gibt Tabelle 4.12.

Tabelle 4.12: Nachweis von Penicillin-Rückständen in Ziegenmilch

Probenart	n	n positiv	% positiv	ng Penicillin G/ml			
				MW	Med	Max	Min
Ziegenmilch	577	9	1,56	7944,46	2,2	79416,5	0,54

In 6 (46,15 %) der 13 beprobten Ziegenmilchbetriebe konnten zumindest einmal Penicillin-Rückstände nachgewiesen werden. Vier der Betriebe betrieben konventionelle Produktionsweise, zwei der Betriebe wirtschafteten nach eigenen Angaben nach ökologischen Prinzipien.

5 DISKUSSION

β -Laktam-Antibiotika gehören in der Veterinärmedizin zu den meist eingesetzten Medikamenten und damit auch zu den am häufigsten nachgewiesenen Hemmstoffen. Ihre Verwendung zur Bekämpfung bakterieller Infektionen beim landwirtschaftlichen Nutztier, insbesondere die intramammäre Applikationsart in der Mastitistherapie, stellt hierbei das größte Risiko der Rückstandsbildung in der Milch dar. Sowohl national als auch international ist Penicillin G das von Tierärzten meist eingesetzte Antibiotikum bei Milchkühen und kommt auch bei Schaf und Ziege sehr häufig zum Einsatz (TERPLAN und ZAADHOF, 1967; GEDEK, 1986; BUSWELL et al., 1989; SUNDLOF, 1995; DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al., 1998; STERNESJÖ und JOHNSSON, 2003; PAYNE et al., 2006). Insgesamt ist die Belastung der Kuhmilch mit Antibiotika-Rückständen relativ gering. So ist aufgrund der Daten des größten europäischen Testlabors für Anlieferungsmilch, des Milchprüfrings Bayern, derzeit von ca. 0,2% hemmstoffpositiven Befunden ($\approx >4\mu\text{g/kg}$ als Penicillin G-Äquivalente) auf Anlieferungsmilchebene auszugehen. Da diese Befunde aber lediglich retrospektiven Charakter aufweisen, d.h. diese Milch mit hoher Wahrscheinlichkeit in die normale Verarbeitung gelangt, kann somit die Dimension hemmstoffhaltiger Milch in der Nahrungskette – unter Berücksichtigung allfälliger Verdünnungseffekte – grob abgeschätzt werden. Bei einer angenommenen mittleren Belastung hemmstoffhaltiger Milch in einer Größenordnung von ca. 10 ng/ml (Penicillin G), was aufgrund der eigenen Untersuchungen einen realistischen Wert darstellen dürfte, resultiert hieraus ein durchschnittlicher Penicillingehalt in Konsummilch von 20 pg/ml. Da keine absolut gleichmäßige Verteilung zu erwarten ist, sind gelegentlich wohl auch Werte über 100 pg/ml zu erwarten. Noch höhere Gehalte könnten sich bei Verarbeitung hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilch eines sehr großen Lieferanten in einer relativ kleinen Molkerei ergeben, dies dürfte jedoch die Ausnahme sein. Mit anderen Worten nimmt der Konsument über Milch und Milcherzeugnisse ständig Penicillin G auf, allerdings in sehr geringen Spuren. Vergleichbare Angaben zur Hemmstoffbelastung von Ziegenmilch liegen bisher nicht vor, so dass der Beitrag dieser Erzeugnisse zur Aufnahme praktisch unbekannt ist.

Rückstände von Penicillinen in Milch stellen sowohl aus technologischer als auch aus gesundheitlicher Sicht ein hohes Risiko dar. Die Gefährdung des Verbrauchers besteht in erster Linie in der Auslösung von Allergien und in der Gefahr der Resistenzbildung humanpathogener Erreger. Die Wahrscheinlichkeit Penicillin mit der Milch aufzunehmen ist

zwar recht gering, dennoch ist eine allergische Reaktion nach Verzehr penicillinhaltiger Lebensmittel möglich (BECKER, 1976; DEWDNEY und EDWARDS, 1984; (SUHREN, 1996; TOLLEFSON und MILLER, 2000).

Im EU-Lebensmittel Hygienerecht, in der VO (EG) 853/2004, sind daher unter anderem die Vorschriften in Bezug auf die Gehalte an Antibiotikarückständen in roher Kuhmilch und Rohmilch anderer Tierarten festgelegt. Rohmilch darf nicht in Verkehr gebracht werden, wenn der Gehalt an Rückständen und Antibiotika über den zugelassenen Mengen für Stoffe liegt, die in der Verordnung (EU) 37/2010 festgelegt sind (Vergleich Tabelle 2.1). Lebensmittelrechtlich ist somit eine Identifizierung und Quantifizierung des Rückstandes erforderlich. Eine andere Zielsetzung hat die Milch-Güte-Verordnung. Diese soll Informationen über die Qualität der Anlieferungsmilch vermitteln, wobei der Nachweis antibiotisch wirksamer Rückstände mit Milchgeldabzug geahndet wird. Eine Identifizierung des den Befund auslösenden Hemmstoffes ist nicht vorgeschrieben. Als Anlieferungsmilch im Sinne der Milch-Güte-Verordnung ist nur die Milch von Kühen definiert. Im Bundesland Bayern werden aber seit einiger Zeit zumindest die an Molkereien liefernden Ziegenmilchbetriebe ebenso wie Kuhmilchbetriebe durch den Milchprüfing kontrolliert, damit auch auf Hemmstoffe (LKV BAYERN, 2006), Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden allerdings bisher nicht veröffentlicht. Selbstvermarktende Ziegenmilchbetriebe sind im Rahmen ihrer Verantwortlichkeit als Lebensmittelunternehmer für die Einhaltung der entsprechenden Rechtsvorschriften (Höchstmengen) verantwortlich, werden allerdings *de facto* diesbezüglich nicht kontrolliert. Da Ziegenmilch in der Direktvermarktung zumeist zu Käse verarbeitet wird und hier die technologischen Störungen durch Antibiotikarückstände zu erwarten sind, sollten diese Betriebe ein hohes Eigeninteresse an technologisch einwandfreier, „Hemmstoff-freier“ Milch haben (KLOPPERT et al., 2000).

Die wirtschaftliche Bedeutung der Ziegenhaltung in Deutschland hat in den letzten 20 Jahren wieder etwas zugenommen, nachdem die Nutzung im Jahr 1977 mit einer Tierzahl von weniger als 40000 Stück ihren historischen Tiefstand erreicht hatte (Hesse, 2002). Insbesondere durch die Nutzung der Direktvermarktung und die damit verbundene höhere Wertschöpfung kann die Ziegenhaltung eine Einkommensalternative zur Rinderhaltung bieten. Darüber hinaus unterliegt die Ziegenmilch nicht den europäischen Milchmengenregelungen („Milchquote“), so dass hier relativ freie Produktionsverhältnisse vorliegen. Das gestiegene Verbraucherinteresse an Ziegenmilch und Ziegenmilchprodukten

spiegeln die Absatzzahlen der Molkereien. In den vergangenen Jahren nahm beispielsweise die Anlieferung von Ziegenmilch in der Andechser Molkerei in Bayern jährlich um je 20 % zu (LKV BAYERN, 2006). Im Vergleich zu anderen Ländern spielt die Ziegenhaltung in Deutschland mit einer Gesamtzahl von 180000 Ziegen im Jahr 2007 (Statistisches Bundesamt; <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Internationales/InternationaleStatistik/Thema/Landwirtschaft/TabJahrbuch1301,property=file.pdf>) trotz beachtlicher Zuwächse aber immer noch nur eine sehr geringe Rolle.

Die in der Praxis eingesetzten Tests zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch – vorwiegend mikrobiologische Systeme auf der Basis des BRT-Tests und Rezeptor-Schnelltests - erlauben keine Aussage über Identität und Quantität des nachgewiesenen Hemmstoffes. Darüber hinaus gibt es nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand keine einzelne Methode, mit der alle Antiinfektiva auf MRL-Niveau erfasst werden können (SUHREN, 2002a und b). Daher wurde ein integriertes Nachweissystem entwickelt, das eine große Anzahl verschiedener Antiinfektiva in Milch detektieren kann bzw. durch Anwendung und Kombination verschiedener Methoden eine bestmögliche Erfassung vieler Substanzen gewährleisten soll (USLEBER et al., 2000; HOLTKÖTTER et al., 2002; SUHREN 2002a; KERP et al., 2004; KRESS et al., 2007).

Die Untersuchung von Ziegenmilch mittels eines integrierten Nachweissystems ist ebenfalls möglich. Hierzu müssen jedoch geeignete Methodenkombinationen ausgewählt werden, da sich nicht alle Testsysteme zur Untersuchung von Ziegenmilch eignen. Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in Ziegenmilch wurden bisher nicht durchgeführt. Einzig der direkte kompetitive Enzymimmuntest LacTek Test (Röhrchenschnelltest, IDEXX Laboratories, Inc., USA) wurde hinsichtlich seiner Eignung für Ziegenmilch getestet. Beim Nachweis von Penicillin G wurde bei diesem Test allerdings das Auftreten falsch-negativer Ergebnisse beobachtet (ZENG et al., 1998).

5.1 Gruppenspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin

Die „Kernmethode“ des in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch ist der gruppenspezifische Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin. Bei diesem Testsystem

wurden die von STRASSER et al. (2003) hergestellten hochaffinen Antikörper verwendet, ein Ampicillin-Konjugat wurde in Anlehnung an LITZ (1995) und USLEBER et al. (1998) hergestellt. Durch die im Vergleich zu STRASSER (2003) höhere Verdünnung des Konjugates (1:1500) konnte der Messbereich des Testsystems und somit auch die hohe Empfindlichkeit nochmals optimiert werden. Die 50 %-Dosis für Penicillin G betrug 0,5-1,5 ng/ml (STRASSER et al. (2003): 2-4 ng/ml). Die Nachweisgrenze konnte von 0,5-1 ng/ml auf 0,3 ng Penicillin G /ml gesenkt werden. Der Test erfasst Penicillin G weiterhin deutlich unterhalb des vorgeschriebenen Höchstwertes von 4 µg/kg. Die breite Gruppenspezifität des Testsystems beruht auf Kreuzreaktionen mit einer Reihe weiterer Penicilline. Kreuzreaktionen mit Cephalosporinen und hydrolysiertem Penicillin waren nicht bzw. kaum messbar.

5.2 Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten (Benzylpenicilloylsäure)

Mit Hilfe des Enzymimmuntest zum Nachweis von Benzylpenicilloylsäure (BPO) konnten innerhalb des integrierten Nachweissystems positive Ergebnisse im Penicillin-EIA bestätigt werden. Mit dem von LITZ (1995) entwickelten und von FLOSS (1997) etablierten Enzymimmuntest liegt eine empfindliche Methode zum Nachweis des Penicillin G-Metaboliten BPO vor. Im Vergleich zu der von ROHNER et al. (1985) beschriebenen Methode weist dieses Testsystem eine höhere Sensitivität und eine deutlich geringere Kreuzreaktion mit der Muttersubstanz Penicillin G auf. Die ursprünglich von LITZ (1995) angegebene Nachweisgrenze von 0,4 ng/ml, die nach den Anwendungsstudien von FLOSS (1997) bereits auf 0,78 ng/ml korrigiert wurde (22 Standardkurven), wurde unter Berücksichtigung der Matrixeinflüsse (Magermilchpulver) nach Auswertung von 50 Standardkurven bei 1 ng/ml ermittelt. Damit ist dieses Testsystem allerdings immer noch völlig ausreichend, in hemmstoffpositiven Proben auf die Anwesenheit von Penicillin G-Metaboliten zu prüfen.

5.3 Nachweis von Penicillin-Rückständen in Kuhmilch mittels integriertem Nachweissystem

5.3.1 Nachweis von Penicillin-Rückständen in künstlich kontaminierter Kuhmilch

Zur Überprüfung des Testsystems wurden zeitgleich mit der zu untersuchenden hemmstoffpositiven Kuhmilch Positiv-Kontrollen eingesetzt. Dazu wurde pasteurisierte Konsummilch durch Zugabe von entsprechend verdünnten Standardlösungen mit dem jeweiligen Analyten versetzt.

Die Wiederfindungsraten für Penicillin G lagen in dem untersuchten Dotierungsbereich von 2 bis 8 ng/ml zwischen 101,4 und 106,4 %. Die Variationskoeffizienten entsprachen der vom Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food geforderten Reproduzierbarkeit für Rückstandsanalysen im Bereich von $\geq 1 \mu\text{g/kg}$ $\leq 10 \mu\text{g/kg}$ (CCRVDF, 2003).

Auch für den Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten lag die Wiederfindung bei einer Probenverdünnung von 1:2 in PBS in einem guten Bereich (103,1 %). Der Variationskoeffizient war bei dieser Probenverdünnung ebenfalls sehr zufrieden stellend (18,7 %). Im Vergleich hierzu lagen die Wiederfindungsraten in der vorangegangenen Arbeit von FLOSS (1997) im Bereich von 125 % bis 172 %. Diese hohen Werte wurden auf unspezifische Einflüsse der Probenmatrix auf das Testsystem zurückgeführt, welche sich trotz Entfettung und Verdünnung der Milch sowie Erstellung der Standardkurve in magermilchpulverhaltiger Lösung nicht ganz eliminieren ließen. Die Milchproben wurden bei dieser Versuchsreihe 1:4 in PBS verdünnt. So beträgt die errechnete Nachweisgrenze für BPO in Milchproben aufgrund der höheren Verdünnung 3,7 ng/ml (FLOSS 1997). Aufgrund der in dieser Arbeit gewählten niedrigeren Verdünnung der Milchproben sinkt auch die errechnete Nachweisgrenze für BPO in Milch auf 2 ng/ml.

Zusätzlich zu den mit Benzylpenicilloylsäure künstlich kontaminierten Milchproben wurden mit Penicillin G (10 ng/ml) dotierte und mit Penicillinase behandelte Milchproben als Positiv-Kontrolle in den Enzymimmuntest zum Nachweis von Penicillin G-Metaboliten eingesetzt. Bei 37 Tests konnten im Mittel 2 ng BPO/ml nachgewiesen werden. Werden die BPO-Rückstände nach intramammärer Applikation von Penicillin G ermittelt, so finden sich 24 h nach Anwendung in etwa die Konzentrationen der Muttersubstanz, 60 h nach Applikation sind noch etwa 30 % der Penicillin G Konzentration vorhanden (ROHNER et al., 1985).

5.3.2 Nachweis von Penicillin-Rückständen in hemmstoffpositiver Kuhmilch

20 Jahre nach Festsetzung von Höchstmengen für Penicilline im Rahmen der Verordnung EG 2377/90 existieren noch keine wirklich routinetauglichen physikalisch-chemischen Referenzverfahren. Auch wenn mittlerweile zahlreiche Verfahren zum individuellen quantitativen Nachweis aller β -Lactam-Antibiotika insbesondere auf der Basis der LC-MS/MS beschrieben wurden (z.B. KANTIANI et al., 2009), so ist doch die praktische Verfügbarkeit von Labors, die solche Untersuchungen anbieten, derzeit noch nicht gegeben. In der täglichen Praxis zeigt sich aber bereits jetzt die Notwendigkeit einer Differenzierung und Quantifizierung, beispielsweise im Zusammenhang mit Schadensersatzansprüchen. Unstimmigkeiten zwischen Landwirt und Molkerei sind keine Seltenheit, denn positive Hemmstoffbefunde bringen für den Betroffenen hohe finanzielle Verluste mit sich.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten integrierten Nachweis- und Differenzierungssystem konnte durch Kombination der verschiedenen dabei verwendeten Testprinzipien mit zusätzlicher Penase-Behandlung der Milchprobe in den meisten Fällen eine Identifizierung und Quantifizierung des verursachenden β -Laktam-Antibiotikums erreicht werden. Durch Integration weiterer Enzymimmuntests z. B. für Streptomycine und Tetracycline konnte das Analysensystem erweitert werden. β -Laktam-Antibiotika sind allerdings immer noch die häufigste Ursache für hemmstoffpositive Milchproben. So konnten während eines Untersuchungszeitraumes von über vier Jahren (10/2001-12/2005) in 69 von 79 (87,3 %) hemmstoffpositiven Milchproben entweder Penicillin- oder Cephalosporin-Rückstände nachgewiesen werden. Dies ist nicht überraschend, da Antibiotika, die zur Behandlung von Milchkühen eingesetzt werden, sehr häufig β -Laktam-Antibiotika enthalten. Zum anderen liegt das Erfassungsmuster des im Rahmen der Milchgüteverordnung eingesetzten Hemmstofftests ebenfalls bei den β -Laktam-Antibiotika, d. h. Rückstände dieser Wirkstoffgruppe werden in der Routine erfasst, während einige andere Antibiotika mit größerer Wahrscheinlichkeit unentdeckt bleiben.

Penicillin G wurde in der vorliegenden Arbeit in 61 der 79 untersuchten Milchproben identifiziert (77,2 %). Somit werden die Angaben aus der Literatur bestätigt, Penicillin G ist immer noch der am häufigsten nachgewiesene Hemmstoff in Milch. Die Rückstandskonzentration lag zumeist im Bereich des ein- bis zweifachen MRL (4 ng/ml). In einzelnen Fällen wurden aber auch Gehalte über 100 ng Penicillin G/ml festgestellt (Tabelle

4.8). Diese Höchstmengenüberschreitungen um ein Vielfaches des MRL-Wertes unterstreichen die Bedeutung regelmäßiger Hemmstoffuntersuchungen. In einem Fall war mittels gruppenspezifischem Enzymimmuntest für Penicilline nur noch eine geringe Konzentration unter 2 ng/ml nachweisbar. Es ist jedoch davon auszugehen, dass während der Lagerung der Proben bis zum Probeneingang Penicillin G teilweise abgebaut wurde, so dass die ursprünglich beanstandete Rückstandskonzentration vermutlich höher war. Obwohl aufgrund der Einzelfallsituation bei jeder Probe ein durchschnittlicher Gehalt nicht angegeben werden kann, scheint doch ein Wert von ca. 10 ng/ml (Penicillin G-Äquivalente) als typischer Gehalt bei Höchstmengenüberschreitungen vorzuliegen. Insgesamt war die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Enzymimmuntests und der BRT-Hemmstofftests gut. Im BRT-Test negative Proben waren auch in den enzymimmunologischen Testsystemen negativ bzw. nur schwach positiv, d.h., die ermittelten Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze des BRT-Tests von 2 ng Penicillin G/ml.

In acht der 79 Proben (10,1 %) konnten Cephalosporine nachgewiesen werden. Der Vergleich der prozentualen Anteile der in positiven Milchproben identifizierten Hemmstoffe pro Jahr (Abb. 4.3) zeigt, dass dieser Wirkstoffgruppe in den letzten Jahren vermehrt Bedeutung zukommt. Auch dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur (GILLETTE, 2001; ZWALD et al., 2004). Die Konzentrationshöhe der nachgewiesenen Cephalosporinrückstände weist auf eine nicht fachgerechte Applikation des Medikaments hin, denkbar wäre eine intramammäre Applikation. MEIER (2008) betont die generelle Problematik des Ceftiofur-Nachweises in der Routinekontrolle. Bei fachgerechter (d.h. bei Rindern subcutaner) Applikation von Ceftiofur-Präparaten kommt als Rückstandsbildner praktisch nur der Metabolit Desfuroylceftiofur (DFC) in der Milch vor. Das bedeutet, dass ein Nachweis der Muttersubstanz Ceftiofur in Milch zwingend auf eine nicht zugelassene intramammäre Applikation hinweist, da nur hier eine Verstoffwechslung unterbleibt.

In lediglich drei der 79 Proben (3,8 %) konnte mit den zur Verfügung stehenden Verfahren kein Antibiotikum als Wirkstoff identifiziert werden. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Einsatz eines „untypischen“ Antibiotika-Präparates zurückzuführen, eventuell auch auf Desinfektionsmittelrückstände; eine unspezifische Reaktion des (positiven) Hemmstofftests kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Insgesamt konnte der Einsatz des integrierten Systems aber bei 76 von 79 Milchproben zur Lösung von Problem- oder Streitfällen beitragen. Bezeichnenderweise wurde in zahlreichen Fällen vom Milcherzeuger

zunächst die Verwendung eines Antibiotikapräparats bestritten. Bei konkreter Angabe des Wirkstoffs und (beispielsweise über BPO-Metaboliten) der vermutlichen Applikationsform wurde dann häufig doch ein bestimmter Antibiotikaeinsatz eingeräumt. Teilweise lagen den Befunden auch eklatante Mißverständnisse vor, die mit der üblichen Praxis der Anwendung von Antibiotika durch den Tierhalter zusammenhängen. Beispielsweise wurde in einem Fall das bei einem Tier eingesetzte Präparat „Penethamat“ nach Aussage des Milcherzeugers nicht als Penicillin gewertet.

Die Anwendung des integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände erfordert bei der Interpretation der Testergebnisse in einigen Fällen Erfahrung und kombinatorisches Vermögen. Das Verfahren ist insgesamt relativ zeit- und arbeitsaufwändig, denn je nach Rückstandsbefund müssen eine Reihe von Tests durchgeführt werden, im Vergleich zu physikalisch-chemischen Untersuchungen ist das integrierte System aber wesentlich kostengünstiger. Vorteilhaft ist zudem vor allem die Flexibilität des Verfahrens, da in einem stufenweisen Untersuchungsgang die Ergebnisse eines Tests die nachfolgenden Schritte bestimmen. Eine zusätzliche Vorbehandlung der Proben (Penase, Erhitzung, PABA) liefert nützliche Zusatzinformationen.

5.4 Nachweis von Penicillin-Rückständen in Ziegenmilch

Das Ziel der Untersuchung der Ziegenmilchproben in der vorliegenden Arbeit war es, einerseits die Eignung der Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillin und von BPO für Milch dieser Tierart zu bestimmen. Weiterhin sollte ein Überblick über die Belastung der in Hessen produzierten Ziegenmilch mit Penicillin-Rückständen gewonnen werden.

5.4.1 Modifikation und Etablierung der enzymimmunchemischen Testsysteme

Bis auf den direkten kompetitiven Enzymimmuntest LacTek Test (Röhrchenschnelltest, IDEXX Laboratories, Inc., USA) wurden bisher keine Enzymimmuntests auf ihre Eignung hinsichtlich Ziegenmilch geprüft. Der LacTek Test erbrachte allerdings falsch negative Ergebnisse beim Nachweis von Penicillin G (ZENG et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der quantitative Nachweis von Penicillin G und BPO in künstlich kontaminierter Ziegenmilch während des gesamten Untersuchungszeitraumes anhand von Positiv-Kontrollen überprüft. Die Wiederfindungsraten für Penicillin G lagen in dem untersuchten Dotierungsbereich von 2 bis 32 ng/ml zwischen 88,6 und 137,5 %. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 10,3 und 37,4 %. Das Testsystem zeigte somit bei der Untersuchung von Ziegenmilch mit den veränderten Verdünnungsmodalitäten (20 %-ige statt 10 %-ige Magermilchlösung) eine etwas geringere Stabilität als bei der Untersuchung von Kuhmilch, entsprach aber der vom Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food geforderten Reproduzierbarkeit für Rückstandsanalysen im Bereich von $\geq 1 \mu\text{g/kg} \leq 10 \mu\text{g/kg}$ (CCRVDF, 2003). Die Wiederfindungsraten für Benzylpenicilloylsäure in künstlich kontaminierten Ziegenmilchproben lagen bei einem BPO-Zusatz von 4 bis 16 ng/ml zwischen 95,2 und 123,1 %. Die Variationskoeffizienten lagen mit 12 bis 29,7 % in einem ebenfalls sehr zufrieden stellenden Bereich. Die für die Untersuchung von BPO in Ziegenmilch gewählten Verdünnungen entsprachen den Bedingungen, unter welchen auch Kuhmilch mit diesem Testsystem untersucht wird. Da diese beim gruppenspezifischen EIA zum Nachweis von Penicillin in Ziegenmilch verändert wurden, wurde für dieses Testsystem nochmals die Sensitivität und Reproduzierbarkeit überprüft. Die Auswertung der in 20 %-iger Magermilch-Aqua dest.-Lösung erstellten Standardkurven ergab eine Nachweisgrenze von 0,37 ng Penicillin G/ml. Somit zeichnet sich das Testsystem auch für die Untersuchung von Ziegenmilch durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Penicillin G wird in Ziegenmilch weit unterhalb des vorgeschriebenen Höchstwertes von 4 $\mu\text{g/kg}$ erfasst.

5.4.2 Ergebnisse der Untersuchung von Ziegenmilch auf Penicillin-Rückstände

Die Untersuchung von Ziegenmilch mittels eines integrierten Nachweissystems wäre prinzipiell ebenfalls möglich. Hierzu müssten die Methodenkombinationen, die zur Untersuchung von Kuhmilch ausgewählt wurden verändert werden, da sich nicht alle Testsysteme zur Untersuchung von Ziegenmilch eignen. Der erste Untersuchungsschritt des bestehenden integrierten Nachweissystems, der mikrobiologische Hemmstofftest, wird für die Untersuchung von Ziegenmilch in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Einzig der nach SCHULZE (2002) modifizierte Blättchentest oder der kommerziell erhältliche Delvotest SP (mit nach SCHULZE (2002) verlängerter Inkubationszeit) könnten alternativ eingesetzt werden. Für den Untersuchungsschritt II des integrierten Systems würde sich gegebenenfalls

der Rezeptortest β ta s.t.a.r. anbieten, allerdings müssten zur Eignung dieses Tests noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Ein weiterer in der Literatur als geeignet beschriebener Schnelltest für den Nachweis von Antiinfektiva in Ziegenmilch ist der Charm II Beta-laktam Test. Zu diesem Test liegen ausführlichere Untersuchungen vor (CONTRERAS et al., 1997; ZENG et al., 1998; QUANDT 2006).

Da Penicillin G auch bei der Ziege ein sehr häufig eingesetztes Antibiotikum ist, lag der Schwerpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung der Ziegenmilch auf dem Einsatz der Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillin und dessen Metaboliten BPO. Mittels dieser, für die Untersuchung von Ziegenmilch sehr gut geeigneten Testsysteme wurden insgesamt 577 Ziegenmilchen aus 13 mittel- und nordhessischen Betrieben untersucht. Studien mit vergleichbar hohen Untersuchungszahlen konnten in der Literatur zur deutschen Ziegenmilch nicht gefunden werden. In Studien mit geringeren Fallzahlen erwiesen sich die Ziegenmilchproben zudem immer als hemmstofffrei (HAHN und KNORR 1989; OEFKEN 1993; KNAPPSTEIN et al. 2003). Von den in dieser Arbeit untersuchten 577 Ziegenmilchproben waren insgesamt 9 (1,56 %) mit Penicillin G kontaminiert. Bei zwei Proben (0,35 %) lag der Gehalt an Penicillin G über dem MRL von 4 ng/ml. In einer dieser Proben wurden 7 ng Penicillin G/ml nachgewiesen, nach Penicillinase-Behandlung negativ. Der Gehalt an BPO lag bei 4,6 ng/ml, nach Penicillinase-Behandlung stieg er auf 5,9 ng/ml, was auf die parenterale Gabe von Penicillin G schließen lässt. Der Gehalt an Penicillin G der zweiten Probe lag extrem hoch (60.000-100.000 ng/ml). Bei der Untersuchung dieser Probe auf BPO wurden Werte im Bereich von 20.600-45.500 ng/ml gemessen. Somit ist die Belastung der Ziegenmilch mit 0,35 % Penicillin-positiven Proben insgesamt zwar gering, trotzdem aber dennoch in einer als nicht unerheblich anzusehenden Häufigkeit. Da im Sinne der Milchgüterverordnung nur Kuhmilch kontrolliert wird, erscheint insbesondere nach den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit ein ähnliches Kontrollsystem für Ziegenmilch notwendig. Dass Ziegenmilch in der Werbung und im World Wide Web oftmals als Alternative für Säuglinge und Allergiker angepriesen wird, unterstreicht diese Forderung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit eines integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch überprüft. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Hemmstoffbelastung von Ziegenmilch, d.h. es sollte ein Überblick über die Belastung der in Hessen produzierten Ziegenmilch mit Penicillin-Rückständen gewonnen werden.

Die „Kernmethode“ des integrierten Nachweissystems für Penicillin-Rückstände in Kuhmilch und Ziegenmilch ist ein gruppenspezifischer Enzymimmuntest (EIA) zum Nachweis von Penicillinen. Durch die Herstellung eines optimierten markierten Antigens (Enzymkonjugat) konnte der Messbereich des Testsystems und somit auch die Nachweisgrenze optimiert werden. Die 50%-Dosis für Penicillin G betrug 0,5–1,5 ng/ml, die Nachweisgrenze lag bei 0,3 ng/ml. Der Test erfasst Penicillin G deutlich unterhalb des vorgeschriebenen Höchstwertes von 4 µg/kg und weist eine breite Gruppenspezifität für alle relevanten Penicilline auf. Als weitere methodische Bestandteile des integrierten Nachweissystems wurden für β-lactam-Antibiotika mikrobiologische Hemmstofftests und gruppenspezifische qualitative Rezeptortests eingesetzt, im Bedarfsfall kamen weitere Enzymimmuntests für andere Antiinfektiva zu Einsatz.

Während eines Untersuchungszeitraumes von über vier Jahren (10/2001-12/2005) konnten in 69 von 79 (87,3 %) hemmstoffpositiven Kuhmilchproben entweder Penicillin- oder Cephalosporin-Rückstände nachgewiesen werden. Penicillin G wurde in 61 der 79 untersuchten Milchproben identifiziert (77,2 %). Somit ist Penicillin G immer noch der am häufigsten nachgewiesene Hemmstoff in Milch. Die Rückstandskonzentration lag zumeist im Bereich des ein- bis zweifachen MRL (4 ng/ml). In einzelnen Fällen wurden aber auch Gehalte über 100 ng Penicillin G/ml festgestellt. In acht der 79 Proben (10,1 %) konnten Cephalosporine nachgewiesen werden.

Die Untersuchung von Ziegenmilch mittels eines integrierten Nachweissystems ist ebenfalls möglich. Hierzu müssen jedoch geeignete Methodenkombinationen ausgewählt werden, da sich nicht alle Testsysteme zur Untersuchung von Ziegenmilch eignen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzymimmuntests zum Nachweis von Penicillin G und seinem Metaboliten Benzylpenicilloylsäure (BPO) in Ziegenmilch modifiziert und etabliert. Mittels

dieser, für die Untersuchung von Ziegenmilch sehr gut geeigneten Testsysteme (Nachweisgrenze von 0,37 ng Penicillin G/ml) wurden insgesamt 577 Ziegenmilchproben (Einzelgemelke) aus 13 mittel- und nordhessischen Betrieben untersucht. Neun Proben (1,56 %) waren mit Penicillin G kontaminiert. Bei zwei Proben (0,35 %) lag der Gehalt an Penicillin G über dem MRL von 4 ng/ml. Somit ist die Belastung der Ziegenmilch mit Penicillin-Rückständen insgesamt zwar gering, trotzdem aber dennoch in einer nicht als unerheblich anzusehenden Häufigkeit.

7 SUMMARY

The present study describes experiences with an identification and quantification program for penicillin-residues in cow's milk and in goat's milk. Additionally, a survey on the occurrence of penicillin residues in goat's milk was performed.

To identify and quantify betalactam antibiotics in inhibitor-positive milk samples, a combination of microbiological inhibitor tests, receptor tests, and enzyme immunoassays (EIA) is used in a step-by-step analysis. A generic EIA for penicillins with improved sensitivity (50% dose concentration for penicillin G 0.5–1.5 ng/ml, detection limit 0.3 ng/ml) was the core method of the program. By this test, penicillin G is detected well below the maximum residue limit (MRL) of 4 µg/kg. The EIA has broad cross-reactivity with all beta-lactam antibiotics which are regulated by MRL's. Further EIAs (isoxazolyl penicillins, cephalosporins) could be employed in this program if necessary.

During the period of four years (10/2001-12/2005), most of the violative milk samples under study contained penicillin or cephalosporin residues (n =79, 87.3 %). In most cases (77.2 %) penicillin G could be identified. This indicates that penicillin G is still the predominant antibiotic responsible for violative bulk tank milk samples. In most of our results, residue levels were close to the MRL value (4 ng/ml), but some samples contained more than 100 ng penicillin G/ml. The second most frequently identified compound were cephalosporins (10.1 %).

The identification and quantification of antibiotic residues in goat's milk by the presented multimethod strategy is also possible. As only some of the existing antibiotic screening tests are applicable for the analysis of goat's milk, suitable combinations of tests must be selected for the analysis of goat's milk. In the present study the generic EIA for penicillins and, to indirectly confirm the presence of penicillin G, an EIA specifically detecting penicillin G metabolites (benzylpenicilloyl metabolites, BPO) were used. A total of 577 milk samples from 13 goat milk farms were analysed with these high sensitive EIAs (detection limit 0.37 ng penicillin G/ml). Nine samples (1.56 %) contained penicillin G, at concentrations exceeding the MRL value (4 µg/kg) in two samples. Compared with about 0.1 % violative cow's bulk tank milk samples as detected during regular control over the last years, the frequency of occurrence of antimicrobial residues in goat's milk is at least at the same level.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABOUZIED, M., M. SARZYNSKI, A. WALSH, H. WOOD, 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
- ADRIANY, A. (1996)
Entwicklung eines modifizierten Brillantschwarzreduktionstests (BRT) zum verbesserten Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Milch
Diss. med. vet., München
- ALLEN, J. C. (1989):
The value of immunoassays to food analysis
In: RITTENBURG, J. H. (Herausgeber): Development and application of immunoassay for food analysis, 59-77
Elsevier Applied Science, London
- ALLISON, J. R. D. (1985)
Antibiotic residues in milk
Br. Vet. J., **141**, 9-16
- ALTHAUS, R., A. TORRES, C. PERIS, M. C. BELTRAN, N. FERNANDEZ und M. P. MOLINA (2003)
Accuracy of BRT and Delvotest Microbial Inhibition Test as affected by composition of ewe's milk
J. Food Prot. **66**, 473-478
- ANTIFANTAKIS, E. M., I. G. MATHIOUDAKIS und K. V. GIANNACOPOULOU (1988)
Possibility of detecting antibiotics in ewe's milk and goat's milk by Delvotest, TTC-test and Intertest
Egyptian Journal of dairy science **16**, 1-8

ARKAWA, H., M. MAEDA, A. TSUJI und A. KAMBEGAWA (1981)
Chemiluminescence enzyme immunoassay of dehydropiandrosterone and its sulfate using
peroxidase as label
Steroids **38**, 453-464

BAILON-PEREZ, M.I., A.M. GARCIA-CAMPANA, M. DEL OLMO-IRUELA, L. GAMIZ-
GRACIA, C. CRUCES-BLANCO (2009)
Trace determination of 10 β -lactam antibiotics in environmental and food samples by
capillary liquid chromatography
J. Chromatogr. A, **47**, 8355–8361

BAUMGARTNER, C. (2002)
Hemmstoffe in der Milch: Testmethoden und Vermeidung
Dtsch. Molkerei-Ztg. **17**, 47-51

BECKER, M. (2005)
LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und
Aminoglycosid-Antibiotika
Diss. rer. nat., Wuppertal

BECKER, W. (1976)
Zur Möglichkeit einer Allergisierung und Auslösung allergischer Erscheinungen nach oraler
Aufnahme von antibiotikahaltigen Lebensmitteln (Literaturlauswertung)
Arch. Lebensmittelhyg. **27**, 181-185

BERGONIER, D., R. DE CREMOUX, R. RUPP, G. LAGRIFFOUL und X. BERTHELOT
(2003)
Mastitis of dairy small ruminants
Vet. Res. **34**, 689-716

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

BRADY, M. S., N. WHITE und S. E. KATZ (1993)

Resistance development potential of antibiotic/antimikrobial residue levels designated as "safe levels"

J. Food Prot. **56**, 229-233

BUSWELL, J. F., C. H. KNIGHT und D. M. L. BARBER (1989)

Antibiotic persistence and tolerance in the lactating goat following intramammary therapy

Vet. Rec. **125**, 301-303

BYGRAVE, J., M. ROSE und J. TARBIN (1995)

A comparison of screening and quantitative test methods for the determination of penicillin in milk

Int. Dairy Fed. Spec. **9505**, 266-268

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

Review of performance-based criteria for methods of analysis for veterinary drug residues in food

Joint FAO/WHO food standards programme, 14. Sitzung des CCRVDF, 4. - 7. März, Washington

CINQUINA, A. L., P. ROBERTI, L. GIANNETTI, F. LONGO, R. DRAISCI, A. FAGIOLO und N. R. BRIZIOLI (2003)

Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection

Optimization and validation

J. Chromatogr. A **987**, 221-226

CONTRERAS, A., M. J. PAAPE, A. L. DI CARLO, R. H. MILLER, und P. RAINARD (1997)

Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats

J. Dairy Sci. **80**, 1113-1118

DEGELAEN, J (1994)

Hemmstoffnachweis in Milch

Dtsch. Milchwirtsch. **45**, 593-596

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A., N. V. ANDERSON, K. BRETZLAFF, C.V.

KIMBERLING, G. MOORE, J. D. ROWE and C. WOLFE (1998)

Overview of diseases and drug needs for sheep and goats. Veterinarians` and producers` perspectives.

Vet. Hum. Toxicol. **40**, Suppl. 1: 7-12

DEWDNEY, J. M. und R. G. EDWARDS (1984)

Penicillin hypersensitivity – is milk a significant hazard?: a review

J. Roy. Soc. Med. **77**, 866-877

DEWDNEY, J. M., L. MAES, J. P. RAYNAUD, F. BLANC, J. P. SCHEID, T. JACKSON, S. LENS und C. VERSCHUEREN (1991)

Risk assesment of antibiotic residues of β -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential

Fd. Chem. Toxic. **29**, 477-483

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

Use of monoclonal antibodies for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk

In: HAAGSMA, N. und R. RUITER: Euroresidue III: conference on residues of veterinary drugs in food, 6-8 May, 1996, 382-386

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1998)

The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multiimmunoaffinity chromatography for penicillins

Analyst **123**, 2749-2754

FABRE, J. M., J. P. MORETAIN, F. ASCHER, P. BROUILLET und X. BERTHELOT
(1995)

Main causes of inhibitors in milk - A survey in one thousand french dairy farms

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

August 1995, p. 27-31

FITZGERALD, S. P., N. O' LOAN, R. I. MCCONNELL, EL O. BENCHIKH und E. KANE
(2007)

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

J. AOAC Int. **90**, 334-342

FLEMING, A. (1929)

On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in
the isolation of *B. Influenzae*

Br. J. Exp. Pathol. **10**, 226-236

FLOSS, M. (1997)

Anwendung enzymimmunchemischer Testsysteme zum Nachweis von Penicillin G und
Penicillin G-Metaboliten in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation

Diss. med. vet. München

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985)

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-

Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3', 5,5'-Tetra,methylbenzidin

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

GAUDIN, V., J. FONTAINE und P. MARIS (2001)

Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor
assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment

Anal Chim Acta **436**, 191-198

GEDEK, W. (1986)

Problematik der Antibiotika- und Desinfektionsmittelrückstände in der Milch im Zusammenhang mit Mastitistherapie und -prophylaxe
Dtsch. Molkerei-Ztg. **107**, 894-897

GILLETTE, G. L. (2001)

Results of a seven-year surveillance of milk safety related to use ceftiofur sodium and ceftiofur hydrochloride
Proc. Annu. Conf. Am. Assoc. Bovine Pract., Conf. Stillwater, OK:
The Association, **34**, 143-144

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

Antibodies to Bradykinin and Angiotensin: A Use of Carbodiimides in Immunology
Science, **144**, 1344-1346

GRIFFITHS, M. W. (1986)

Use of milk enzymes as indices of heat treatment
J. Food Prot. **49**, 696-705

HAENLEIN, G. F. W. (1993)

Producing quality goat milk
Int. J. Anim. Sci., **8**, 79-84

HAHN, G. und S. KNORR (1989)

Zur bakteriologischen, zytologischen und rückstandshygienischen Untersuchung von Schaf- und Ziegenmilch
30. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht 332-342

HEESCHEN, W. und G. SUHREN (1996)

Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk
Milchwiss. **51**, 154-159

HERRE, A. (1992)

Milchgeldabzüge müssen nicht sein! Vorsicht beim Trockenstellen mit Langzeitantibiotika
Milchpraxis **30**, 184-187

HESSE, N. (2002)

Milchziegenhaltung in Deutschland – Historische Betrachtung und Stand der
Milchziegenhaltung im ökologischen Landbau.

Diplomarbeit Fachgebiet Tierernährung und Tiergesundheit, Universität Gesamthochschule
Kassel

Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e. V. (HVL)
(2002)

Jahresbericht 2002

Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e. V. (HVL)
(2003)

Jahresbericht 2003

Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e. V. (HVL)
(2004)

Jahresbericht 2004

HOLTKÖTTER, C., B. KERP, E. SCHNEIDER, A. STRASSER, R. DIETRICH, E.
MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2002)

Anwendung eines integrierten Analysensystems zur Differenzierung, Identifizierung und
Quantifizierung von Antibiotikarückständen in Milch

43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-
Partenkirchen, Tagungsbericht 417-421

HONKANEN-BUZALSKI, T. und G SUHREN (1999)

Residues of antimicrobial agents in milk and their significance to public health and milk
processing

Bulletin of the International Dairy Federation N° 345, p. 11-12

HOU, J. P. und W. POOLE (1971)

β -Lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure

J. Pharm. Sci. **60**, 503-532

HOZOVA, B. und L. MINAROVICOVA (2001)

Verification of suitability of selected detection systems for estimating antibiotic residues in goat's milk

Czech J. FOOD SCI. **19**, 207-212

HSIEH, S.-H., H.-Y. HUANG und S. LEE (2009)

Determination of eight penicillin antibiotics in pharmaceuticals, milk and porcine tissues by nano-liquid chromatography

J. Chromatogr. A, **43**, 7186–7194

JACKMAN, R., J. CHESHAM, S. J. MITCHELL und S. D. DYER (1990)

Performance of a rapid ELISA for penicillin G in milk

J. Soc. Dairy Techn. **43**, 93-95

KANTIANI, L., M. FARRE und D. BARCELO (2009a)

Analytical methodologies for the detection of beta-lactam antibiotics in milk and feed samples

Trends Anal. Chem. **28**, 729-744

KANTIANI, L., M. FARRE, M. SIBUM, C. POSTIGO, M.L. DE ALDA und D. BARCELO (2009b)

Fully Automated Analysis of beta-Lactams in Bovine Milk by Online Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry

Anal. Chem. **81**, 4285-4295

KERP, B., C. KRESS, C. SEIDLER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2004)

Erfahrungen bei der Anwendung eines Identifizierungs- und Quantifizierungssystems für Antibiotikarückstände in Milch

45. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht 252-257

KIERMEIER F. und C. KAYSER (1960)

Zur Kenntnis der Lactoperoxidase. II. Mitteilung: Hitzeinaktivierung der Lactoperoxidase

Z. Lebensmitt.-Untersuch. **113**, 22-33

KIRST, E. (1999)

Lebensmittelhygienische Untersuchungen – Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch

Dtsch. Molkerei-Ztg. **120**, 532-540

KLEIN, G. (1999)

Lebensmittel als potentielle Vektoren für Antibiotikaresistenzen – 1. Mitteilung: Bedeutung von Rückständen und ausgewählten Lebensmittelinfektions- und –intoxikationserregern

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**, 365-369

KLIMA, H. (1980)

Positiver Hemmstofftest in Ziegenmilch mit *B. stearothermophilus*

Arch. Lebensmittelhyg. **31**, 111

KLOPPERT, B., A. EHRENBERG, W. WOLTER und M. ZSCHÖCK

Konzept zur Überwachung und Eigenkontrolle in Schaf- und Ziegenmilcherzeugerbetrieben im Sinne der Milchverordnung

41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht 213-219

KNAPPSTEIN, K., H. UBBEN, G. SUHREN und K. BARTH (2003)

Eutergesundheit und Milchqualität bei Milchschaafen und –ziegen

In: Jahresbericht 2003 der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL)

Standort Kiel, 12, online verfügbar unter: http://bafm.zadi.de/index_2003.htm

KNECHT, B. G., A. STRASSER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, R. NIESSNER und M. G. WELLER (2004)

Automated Microarray System for the Simultaneous Detection of Antibiotics in Milk
Anal. Chem. 2004, 76, 646-654

KRAACK, J. und A. TOLLE (1967)

Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus var. calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch
Milchwiss. **22**, 669-673

KRAACK, J. und A. TOLLE (1969)

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit Brillantschwarz-Reduktionstest. I. Verbesserte Methodik.
Arch. Lebensmittelhyg. **20**, 145-149

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

KROKER, R. (1994)

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen
In: LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER: Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, p.206-242
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

KROKER, R., W. LÖSCHER, J. SIMUNEK, H. TROLLDIENER und F. R. UNGEMACH (1996)

Chemotherapie bakterieller Infektionen
In: FREY, H.-H. und W. LÖSCHER: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, p. 461-465
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

KROLL, S. (2000)

Zur Eignung von Schnelltestverfahren zum Rücksandsnachweis von Beta-laktam-Antibiotika in Milch

Diss. med. vet. München

KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF, E. SCHNEIDER und E. MÄRTBAUER (2000):

Evaluation of commercial rapid tests for β -lactam antibiotics in raw milk

In: VAN GINKEL, L. A. und A. RUITER (Hrsg.)

National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands

Euroresidue IV: Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, 8-10 May, 2000, 693-697

KUNDRAT, W. (1968)

Methoden zur Bestimmung von Antibiotica –Rückständen in tierischen Produkten

Z. Anal. Chem. **243**, 624-630

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

Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch

Arch. Lebensmittelhyg. **43**, 77-88

LITZ, S. (1995)

Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen

Diss. med. vet. München

LOCHBIHLER, E., E. USLEBER, G. TERPLAN, G. ENGELHARDT und P. WALLNÖFER (1995)

Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotika und Sulfonamiden in bayerischer Konsummilch mittels enzymimmunologischer Verfahren.

Arch. Lebensmittelhyg. **46**, 60-62.

LKV BAYERN (2006)

Mitteilungsblatt des Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern
e. V., **2**, 11-14

online verfügbar unter: http://www.lkv.bayern.de/media/mitteilungsblatt_0608.pdf

MÄRTLBAUER, E. (1993)

Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe, 96-140

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

McGRANE, P., M. T. ROWE und S. ANGER (1996)

Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection of a range of antibiotics in
milk

Milchwiss. **51**, 330-332

MEIER, B. (2008)

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

Diss. med. vet. Gießen

MILCHPRÜFRING BAYERN (2000)

Tätigkeitsbericht 1999

Eigenverlag München

MILCHPRÜFRING BAYERN (2001)

Tätigkeitsbericht 2000

Eigenverlag München

MILCHPRÜFRING BAYERN (2002)

Tätigkeitsbericht 2001

Eigenverlag München

MILCHPRÜFRING BAYERN (2003)

Tätigkeitsbericht 2002

Eigenverlag München

MILCHPRÜFRING BAYERN (2008)

Werte & Statistiken

Überblick Jahresvergleich 2006/2007 bis Jahresübersicht 2009

online verfügbar unter: <http://www.mpr-bayern.de>

MITCHELL, S. J., R. JACKMAN, M. P. DIBB-FULLER, D. P. MOSWETSI und A. J. BROWN (1992)

Detection of dihydrostreptomycin in milk by ELISA, following intramammary treatment with Streptopen

In: MORGAN, M. R. A., C. J. SMITH und P. A. WILLIAMS: Food safety and quality assurance: application of immunoassay systems, pp. 181-184

Elsevier, London u.a.

MITCHELL, M. J. und A. J. YEE (1995)

Antibiotic use in animals and transfer of drug resistance to humans: Should we stop treating animals with these drugs?

Dairy, Food Environ. Sanitation **15**, 484-487

MITCHELL, 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

MUSSER, J. M. B. und K. L. ANDERSON (1999)

Using drug residue screening tests to investigate contamination of milk

Vet. Med. **94**, 474-479

NAZINA, T.N., TOUROVA, T.P., POLTARAUS, A.B., NOVIKOVA, E.V., GRIGORYAN, A.A., IVANOVA, A.E., LYSENKO, A.M., PETRUNYAKA, V.V., OSIPOV, G.A., BELYAEV, S.S. UND M.V. IVANOV, MV (2001)

Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. Thermodenitrificans*
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 433-446

NOUWS, J., H. van EGMONT, 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

OELFKEN, K. (1993)

Zellgehalt, Mastitiserreger und Hemmstoffe in Ziegenmilch

Diss. med. vet. München

PAYNE, M. A., J. G. BABISH, M. BULGIN, M. LANE, S. WETZLICH und A. L. CRAIGMILL (2002)

Serum pharmacokinetics and tissue and milk residues of oxytetracycline in goats following a single intramuscular injection of a long-acting preparation and milk residues following a single subcutaneous injection

J. vet. Pharmacol. Therap. **25**, 25-32

PAYNE, M. A., A. CRAIGMILL, J. E. RIVIERE und A. I. WEBB (2006)

Extralabel use of penicillin in food animals

J. Am. Vet. Med. Assoc. **229**, 1401-1403

QUANDT, B. (2006)

Identifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch mittels Schnelltestsystemen

Diss. med. vet. München

ROHNER, P., M. SCHÄLLIBAUM und J. NICOLET (1985)

Detection of Penicillin G and its Benzylpenicilloyl (BPO) –Derivates in Cow Milk and Serum by means of an ELISA

J. Food Prot. **48**, 59-62

ROSIN, H. (1996)

Antibiotika und Chemotherapeutika – Antiinfektiöse Therapie

In: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, p. 624-637

B I Wissenschaftsverlag, Mannheim/Leipzig/Wien/Zürich

RULE, R., L. MORENO, J. M. SERRANO, A. GARCIA ROMAN, R. MOYANO und J. GARCIA (2001)

Pharmacokinetics and residues in milk of oxytetracyclines administered parenterally to dairy goats

Aust. Vet. J. **79**, 492-496

RULE, R., C. CORDIVIOLA, M. VITA und R. LACCHINI (2004)

Correlations between milk production and kinetic variables in milk of cephalothin administered to lactating goats

Vet. Med. – Czech **49**, 370-372

SCHÄLLIBAUM 1986

Kontamination der Milch mit Antibiotikarückständen – Situationsanalyse Schweiz

Dtsch. Molkerei-Ztg. **107**, 784-786

SCHNAPPINGER, P. (1992):

Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Streptomycin

Diss. med. vet. München

SCHNAPPINGER, P., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1993)
Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk
Food Agric. Immunol. **5**, 67-73.

SCHNEIDER, E., P. SCHNAPPINGER, R. DIETRICH, E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER
und G. TERPLAN (1994)
Schnellnachweise von Antibiotika- und Sulfonamidrückständen in Milch unter
Berücksichtigung von technologischen Störgrenzen und Höchstmengen
Welt der Milch **48**, 3-7

SCHOLZ, S. (1998)
Nachweis von Antiinfektiva in Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis mittels
mikrobiologischer Hemmstofftests
Diss. vet. med. München

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

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

SIERRA, D., A. SANCHEZ, A. CONTRERAS, C. LUENGO, J. C. CORRALES, C. T.
MORALES, C. DE LA FE, I. GUIRAO und C. GONZALO (2009)
Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for β -lactams in goat's milk
J. Dairy Sci. **92**, 3585–3591

SMITH, C. J. (1989)

Evolution of the Immunoassay

In: RITTENBURG, J. H. (Herausgeber): Development and application of immunoassay for food analysis, 3-27

Elsevier Applied Science, London

SPINKS, C. A. (2000)

Broad-specific immunoassay of low molecular weight food contaminants: new path to utopia

Trends in Food Science & Technology **11**, 210-217

STRASSER, A. (2003)

Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch – Herstellung der immunchemischen Komponenten

Diss. med. vet. München

STRASSER, A., E. USLEBER, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH, C. BÜRK und E. MÄRTLBAUER (2003)

Improved enzyme immunoassay for group-specific detection of penicillins in milk

Food Agric. Immunol. **15**, 135-143

STERNESJÖ, A und G. JOHNSON (2003)

The Swedish system for detection and separation of β -lactam antibiotics contaminated milk – a practical approach

Milchwiss. **58**, 68-69

SUHREN, G. (1996)

Untersuchungen zum Einfluss von Rückständen von antimikrobiell wirksamen Substanzen in Milch auf kommerziell eingesetzte Starterkulturen in Modellversuchen

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **48**, 131-149

SUHREN, G. (2002a)

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch – rechtliche Grundlagen,
Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme
Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **54**, 35-73

SUHREN, G. (2002b)

Antibiotisch wirksame Substanzen in Milch – Bedeutung, rechtliche Aspekte und Nachweis
Dtsch. Molkerei-Ztg. **123**, 224-231

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1996)

Detection of inhibitors in milk by microbial tests – a review
Nahrung **40**, 1-7

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998)

Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch - Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-
Laktamtest
Dtsch. Molkerei-Ztg. **14**, 674-681

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (2002)

Messbarkeit und Entwicklung der hygienischen Wertigkeit des Rohstoffes Milch
Dtsch. Milchwirtsch. **18**, 772-775

SUHREN, G., P. HAMMER und W. HEESCHEN (1994)

Hemmstoffe, Antibiotika und Sulfonamide
Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **46**, 237-248

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

Zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Rückstände in Milch auf der Tankwagenebene
37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-
Partenkirchen, Tagungsbericht 315-322

SUHREN, G., R. BREUKERS und J. REICHMUTH (1998)

Beschreibung von Kriterien zur Beurteilung mikrobiologischer Hemmstofftests

Dtsch. Milchwirtsch. **3**, 100-104

SUNDLOF, S. F., J. B. KANEENE und R. A. MILLER, (1995)

National survey on veterinarian-initiated drug use in lactating dairy cows

J. Am. Vet. Assoc. **207**, 347-351

TERPLAN G. und K. J. ZAADHOF (1967)

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch – eine kurze Übersicht

Milchwiss. **22**, 761-771

TERPLAN G. und K. J. ZAADHOF (1975)

Antibiotika, Hormone und Thyreostatika in Lebensmitteln tierischer Herkunft sowie ihre Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit

Dtsch. Ärztebl. **72**, 344-350

THAL, J. (2006)

Entwicklung eines immunchemischen Nachweisverfahrens für Cefquinom

Diss. med. vet. Gießen

TOLLEFSON, L. und M. A. MILLER (2000)

Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact

J. AOAC Int. **83**, 245-254

USLEBER, E., E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994)

Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs - eine Übersicht

Archiv für Lebensmittelhygiene **45**, 25-48

USLEBER, W., S. LITZ und E. MÄRTLBAUER (1998)

Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics

Food Agric. Immunol. **10**, 317-324

USLEBER, E., R. DIETRICH, A. STRASSER, K.-J. ZAADHOF und E. MÄRTLBAUER (2000)

Substanzdifferenzierung von betalaktam-Antibiotika in Hemmstoff-positiven Milchproben unter Verwendung von Rezeptor- und Enzymimmuntests

41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht 221-225

VORREITER, A. (1996)

Zur Eignung von kommerziellen mikrobiologischen Hemmstofftests zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf das Vorhandensein von Antiinfektiva

Diss. med. vet., München

WONG, S. S. (1993)

Chemistry of protein conjugation and cross-linking, 23-25

CRC Press, Inc., USA

WRIGHT, W. W. und C. HAROLD (1960)

Antibiotic residues in milk

J. Am. Vet. Assoc. **137**, 525-533

XU, Z., H.-Y. WANG, S.-X. HUANG, Y.-L. WEI, S.-J. YAO und Y.-L. GUO (2010)

Determination of β -Lactamase Residues in Milk Using Matrix-Assisted Laser

Desorption/Ionization Fourier Transform Mass Spectrometry

Anal. Chem., **5**, 2113–2118

ZAADHOF, K.J., MÄRTLBAUER, E., VORREITER, A. und SCHWEIZER, L. (1997)

Studies on the applicability of commercial inhibitor tests as screening test for the presence of antiinfektiva in milk and milk-based products

Arch. Lebensmittelhyg. **48**, 127-132

ZENG, S. S., E. N. ESCOBAR und I. BROWN-CROWDER (1996)

Evaluation of screening tests for detection of antibiotic residues in goat milk

Small Rum. Res. **21**, 155-160

ZENG, S. S., S. HART, E. N. ESCOBAR und K. TESFAI (1998)

Validation of antibiotic residue tests for dairy goats

J. Food Prot. **61**, 344-349

ZORRAQUINO, M.A, ROCA, M., FERNANDEZ, N., MOLINA, M.P. und R. ALTHAUS
(2008)

Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk

J Food Protect **71**, 1193-1198

ZWALD, A. G., P. L. RUEGG, J. B. KANEENE, L. D. WARNICK, S. J. WELLS, C.
FOSSLER und L. W. HALBERT (2004)

Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy
farms

J. Dairy Sci. **87**, 191-201

Zitierte Gesetze, Verordnungen und amtliche Untersuchungsverfahren

Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts vom 1. September 2005, Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB), zuletzt geändert durch die Verordnung, Verordnung vom 3. August 2009 (BGBl. I S. 2630)

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 (ABl. EG Nr. L 152 S. 11)

(Zuvor: 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. EG Nr. L 224 S. 1))

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

Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz AMG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 28. September 2009 (BGBl. I S. 3172, (3578))

Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV) in der Fassung vom 8. Juli 2009 (BGBl. I S. 1760)

EU-Lebensmittel Hygienerecht, Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (ABl. EU Nr. L 139 S. 55-206 vom 30.4.2004, berichtigt durch ABl. EU Nr. L 226, S. 22-82 vom 25.06.2004)

EU-Lebensmittel Hygienerecht, Verordnung (EG) Nr.854/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (ABl. EU Nr. L 139 S. 206-320 vom 30.4.2004, berichtigt durch ABl. EU Nr. L 226, S.83-127 vom 25.06.2004)

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güte-Verordnung) vom 9.7.1980 (BGBl I, S. 878), zuletzt geändert durch Artikel 17 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816)

Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen (ABl. Nr. L 125 vom 23.5.1996 S. 10-32) zuletzt geändert durch Richtlinie 2006/104/EG des Rates vom 20. November 2006 (ABl. EU Nr. L 363 vom 20.12.2006 S. 352)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (früher § 35 LMBG)

Nachweis von Hemmstoffen in Milch – Agar-Diffusionsverfahren (Blättchentest); L 01.00-06
Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch – Agar-Diffusionsverfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest); L 01.01-05

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

Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch – Agar Diffusionsverfahren mit *Bacillus cereus* (TTC-Reduktionstest); L 01.00-62

Analyse- und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch - Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden; L 01.00-42 (EG) bis 52 (EG), VIII

9 EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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.

10 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. E. Usleber danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die zahlreichen wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bei der Anfertigung dieser Arbeit, die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. E. Schneider für die hervorragende Betreuung während des praktischen Teils und ihre Bereitschaft, sich auch Jahre später mit großer Geduld (in Anwesenheit von drei Kleinkindern!) wieder in das Thema zu vertiefen und die Arbeit mit mir durchzusehen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Co-Doktoranden/Innen, besonders Caroline Gassen und Bianca Meier, für viele hilfreiche Ratschläge, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, aber vor allem für die schöne Zeit, die wir miteinander hatten. Steffi Breitbach und Kai Jendretzke danke ich außerdem für die Hilfe beim Ziegenmilchproben gewinnen.

Danke auch an alle Mitarbeiter/Innen der Professur für Milchwissenschaften für die stetige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima, insbesondere Renate Stumpf, die immer eine helfende Hand übrig hatte und Conny Eichmann, die mich in die Geheimnisse des mikrobiologischen Arbeitens einweihte und mit der es nie langweilig wird.

Für die Bereitstellung der verwendeten Proben und das entgegengebrachte Interesse an dieser Arbeit danke ich dem HVL und allen beteiligten Ziegenzüchtern aus Hessen.

Mein ganz besonderer Dank gilt all denjenigen, die daran geglaubt haben, dass diese Arbeit noch fertig gestellt wird und die mich immerzu ermutigt haben. Von Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, und die, während der Erstellung des schriftlichen Teils dieser Arbeit, unzählige Stunden mit der Kinderbetreuung verbracht haben. Ohne sie wäre die Arbeit nie fertig geworden. Abschließend danke ich meinem Mann, der mich während des praktischen Teils auf jegliche Art und Weise unterstützt hat und der mir, wenn ich mit dem Schreiben mal nicht so vorangekommen bin, abends stets seelischen (und kulinarischen) Bestand leistete. Vielen Dank!

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: 978-3-8359-5686-5



9 47 8 3 8 3 5 1 9 3 6 8 6 5