

BETA-LAKTAMASE ALS ANALYTISCHES HILFSMITTEL BEI DER HEMMSTOFF-IDENTIFIZIERUNG IN MILCH

—

Untersuchungen zur Inaktivierungseffizienz

A photograph of a glass of milk and a cow in a field. The glass is on the left, filled with white milk. The cow is on the right, looking towards the camera. The background is a bright blue sky and green grass.

TINKA KRISTINA ANIKA FINGERHUTH

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 2009

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 2009

© 2009 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. Ewald Usleber

**Beta-Laktamase als analytisches Hilfsmittel bei der
Hemmstoff-Identifizierung in Milch**
—
Untersuchungen zur Inaktivierungseffizienz

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

Tinka Kristina Anika Fingerhuth

Tierärztin aus Wetzlar

Gießen 2009

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

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

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

Prof. Dr. C. Lämmler

Tag der Disputation: 14.12.2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Hemmstoffe in der Milch	3
2.1.1	Allgemeines.....	3
2.1.2	Ursachen von Antibiotika-Rückständen in der Milch.....	3
2.2	Auswirkungen von Antibiotika in der Milch für den Verbraucher.....	7
2.2.1	Gesundheitliche Risiken.....	7
2.2.2	Technologische Risiken	8
2.3	Gesetzliche Bestimmungen und Richtlinien	8
2.4	Charakterisierung der in die Untersuchung einbezogenen Substanzen	11
2.4.1	β -Laktam-Antibiotika.....	11
2.4.1.1	Allgemeines.....	11
2.4.1.2	Penicilline.....	11
2.4.1.3	Cephalosporine.....	14
2.4.1.4	Wirkungsmechanismen	17
2.4.1.5	Wirkungsspektrum	17
2.4.2	β -Laktamasen	18
2.4.3	β -Laktamase-Inhibitoren	21
2.5	Nachweisverfahren für β -Laktam-Antibiotika in Milch	22
2.5.1	Mikrobiologische Verfahren für β -Laktam-Antibiotika	24
2.5.1.1	Agardiffusionsverfahren.....	25
2.5.1.2	Rezeptorbindungstests.....	27
2.5.2	Physikalisch-chemische Verfahren	29
2.5.3	Immunologische Verfahren.....	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Materialien und Geräte.....	30
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	30
3.1.2	β -Laktam-Antibiotika und Penicillinase	30
3.1.3	Puffer und Lösungen	31

3.1.4	Brillantschwarz-Reduktionstest	31
3.1.5	Geräte	31
3.1.6	Probenmaterial	31
3.1.7	Datenverarbeitung	32
3.2	Methodik	32
3.2.1	Herstellen der Antibiotika-Stammlösungen und -Gebrauchslösungen	32
3.2.2	Probenherstellung.....	33
3.2.3	Herstellung der Penicillinase-Konzentrationen.....	33
3.2.4	Ermittlung der minimalen Penicillinase-Konzentration zur Inaktivierung der Antibiotika.....	35
3.2.5	Ermittlung des Einflusses der Inkubationszeit	36
3.2.6	Ermittlung des Einflusses der Inkubationstemperatur	36
3.2.7	Durchführung des Brillantschwarz-Reduktionstests.....	36
3.2.8	Auswertung	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zur vollständigen Inaktivierung verschiedener β -Laktam-Antibiotika.....	39
4.2	Einfluss der Inkubationszeit auf die vollständige Inaktivierung verschiedener β -Laktam-Antibiotika.....	49
4.3	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die vollständige Inaktivierung verschiedener β -Laktam-Antibiotika.....	55
5	Diskussion	66
5.1	Erfassbarkeit von β -Laktam-Antibiotika im Brillantschwarz-Reduktionstest	67
5.2	Empfindlichkeit der verschiedenen β -Laktam-Antibiotika gegenüber der verwendeten Penicillinase	67
5.3	Abweichung zwischen visueller und photometrischer Auswertung	68
5.4	Inkubationszeit	68
5.5	Inkubationstemperatur.....	69
5.6	Einsatz der Penicillinase im integrierten Nachweisverfahren.....	69

6	Zusammenfassung	71
7	Summary	72
8	Literaturverzeichnis.....	73
9	Abkürzungsverzeichnis.....	86

1 Einleitung

Mit dem breiten veterinärmedizinischen Einsatz von β -Laktam-Antibiotika bei Milchkühen, speziell in der Mastitistherapie und -prophylaxe, ist auch das Risiko einer Rückstandsbildung in der Milch gegeben. Aufgrund der potenziellen Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher und des störenden Einflusses auf die Herstellung fermentierter Milchprodukte wurden Rückstandshöchstmengen (Maximum Residue Limits, MRLs) für β -Laktam-Antibiotika in Milch gemäß Verordnung (EWG) 2377/90 (kürzlich aufgehoben durch VO (EG) Nr. 470/2009, die Anhänge 1-4 wurden jedoch unverändert übernommen), festgelegt. Allein in Deutschland werden jährlich mehrere Millionen Untersuchungen von Milchproben auf β -Laktam-Antibiotika und andere „Hemmstoffe“ durchgeführt. Zur Identifizierung und Quantifizierung der β -Laktam-Antibiotika auf MRL-Niveau eignen sich integrierte Nachweissysteme unter Einbeziehung von mikrobiologischen Hemmstofftests, Rezeptortests und enzymimmunochemischen Verfahren auf verschiedenen Untersuchungsebenen.

Der Einsatz von β -Laktamasen (Penicillinasen) zur diagnostischen Inaktivierung von β -Laktam-Antibiotika liefert zu Identifizierungs- und Bestätigungszwecken in der Routinediagnostik oft wertvolle Zusatzinformationen hinsichtlich der Hemmstoffursache. Die Vollständigkeit und die Geschwindigkeit der β -Laktamase-Reaktion hängen sowohl von der Seitenkettenkonfiguration der β -Laktam-Antibiotika als auch von Faktoren wie (Produkt-)spezifischer Enzymaktivität, Temperatur, Konzentration und pH-Wert ab. Sind die jeweiligen Inaktivierungsbedingungen für verschiedene Wirkstoffe bekannt, so kann das Ergebnis routineüblicher Nachweisverfahren nach zusätzlicher Penicillinasebehandlung von Milchproben im Hinblick auf eine Eingrenzung der in Frage kommenden Wirkstoffe interpretiert werden. In der Routinediagnostik von Milch auf Hemmstoffe wird zwar der Einsatz von Penicillinase als analytisches Hilfsmittel seit vielen Jahren praktiziert, allerdings fehlten bisher systematische Studien zur Wirksamkeit von Penicillinase bei den in der Milch am häufigsten eingesetzten Antibiotika. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Fehlinterpretationen vorkommen, bedingt durch unvollständige Inaktivierung von β -Laktam-Antibiotika.

Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften von Penicillinase bezüglich Penicillinasekonzentration sowie Inkubationszeit und -temperatur zur Inaktivierung wichtiger β -Laktam-

Antibiotika als Zusatzreagenz für den Einsatz in den verschiedenen Verfahren des integrierten Nachweissystems zu bestimmen.

2 Schrifttum

2.1 Hemmstoffe in der Milch

2.1.1 Allgemeines

Als Hemmstoffe werden natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Stoffe bezeichnet, die chemische und biochemische Reaktionen, insbesondere Wachstum und Vermehrung von Mikroorganismen, hemmen oder verhindern können. Im engeren Sinne der Lebensmittelhygiene sind Hemmstoffe Substanzen, die die zur Herstellung fermentierter Lebensmittel eingesetzten Mikroorganismen in ihrer Stoffwechselaktivität inhibieren. Neben den in der Milch vorhandenen originären Hemmstoffen wie Laktoferrin, Lysozym und das Laktoperoxidase-Thiocyanatsystem sind typische Hemmstoffe z.B. Rückstände von Reinigungs-, Desinfektions-, Konservierungsmitteln oder Arzneimittel mit antimikrobieller Wirkung. In Hessen betrug der Anteil der positiv getesteten Proben im Prüfungsjahr 2001/2002 0,12%, im Prüfungsjahr 2002/2003 0,11% und im Prüfungsjahr 2003/2004 0,08% (HVL, Jahresberichte 2002, 2003, 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden in Bayern gefunden. Im Jahre 2006 waren 0,21 % der auf Hemmstoffe untersuchten Proben positiv, im Jahre 2007 lag der Prozentsatz bei 0,19 % (MILCHPRÜFRING BAYERN, Jahresauswertung 2006, 2007).

Aufgrund ihres Einsatzes in der Mastitistherapie und –prophylaxe spielen in der Milch vor allem die Penicilline und andere β -Laktam-Antibiotika eine große Rolle (TERLAN und ZAADHOF, 1967; SUHREN und REICHMUTH, 1998a). Diese Rückstände stellen zum einen ein gesundheitliches Risiko für den Konsumenten dar, zum anderen ein technologisches Problem bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte (BEYER, 1986).

2.1.2 Ursachen von Antibiotika-Rückständen in der Milch

Eine Kontamination der Milch mit Antibiotika-Rückständen kann auf sekretorischem oder postsekretorischem Weg erfolgen. Als typische Ursachen der postsekretorischen Kontamination, der wahrscheinlich die größere Bedeutung zukommt (SCHÄLLIBAUM, 1989), wurden ungenügende Reinigung der Melkgerätschaften, eine falsche Melkreihenfolge oder die Ver-

wechslung der Milch behandelter und nicht behandelter Kühe festgestellt (MILCHPRÜFRING BAYERN E.V., 1992).

Gelangen Hemmstoffe über den Stoffwechsel des Tieres in die Milch, entstehen sekretorische Kontaminationen. Die intramammäre Verabreichung antibakteriell wirksamer Arzneimittel ohne entsprechende lebensmittelhygienische Vorsichtsmaßnahmen stellt durch die Erzielung hoher Konzentrationen in der Milch eine wichtige Kontaminationsquelle dar (GEDEK, 1984). Auch nach parenteraler (subkutan, intramuskulär, intravenös) oder oraler Gabe von Antibiotika kann es zu Rückständen in der Milch kommen (TERPLAN und ZAADHOF, 1967). Die heute in der Tiermedizin eingesetzten Präparate (Tabelle 1) sind in der Regel mit einer Wartezeit belegt, die eine Sicherheitsspanne beinhaltet. Ein nicht fachgerechtes Einsetzen des Medikaments (Nichteinhaltung der Wartezeit, Überdosierung) führt zu Antibiotika-Rückständen in der Milch. Eine zu frühe Abkalbung nach dem Trockenstellen mit Langzeitantibiotika kann zu Beginn der Laktation ebenfalls zu einem positiven Hemmstoffergebnis führen (HILL und SMALL, 1985; FEUERSTEIN, 1987). Über die Bestandsmilch des einzelnen Erzeugers kann es zur Kontamination eines ganzen Tanksammelwagens kommen.

Tabelle 1: Beispiele für einige wichtige in der Veterinärmedizin eingesetzte Präparate mit Angabe von Herstellername, Applikationsart, Indikation und Wartezeit

Präparat	Herstellername	Applikationsart	Indikation	Wartezeit Milch in Tagen
Benzylpenicillin	ProPen 3000 [®] , Urso-Mamycin P [®]	intramammär	Mastitis	6
Benzylpenicillin und Dihydrostreptomycin	Veracin compositum [®]	i.m., s.c.	Bronchopneumonie, Enteritis, Endometritis, Cystitis, Wundinfektionen	17
Benzylpenicillin-Procaïn	Procaïn Penicillin G [®]	i.m., intramammär	Infektionen des Urogenitaltraktes, der Haut, Klauen oder Gelenken	6
Ampicillin	Ampivet 10% ad us vet. [®]	i.m.	Infektionen des Respirations- oder Gastrointestinaltraktes, Coli-Mastitiden, Peritonitis, Panaritium	4
Ampicillin und Cloxacillin	Gelstamp Injektor [®]	intramammär	Mastitis	3
Amoxicillin	Duphadox LA [®] Amoxicillin 15% WDT [®] Amoxicillin Uterusstäbe [®]	i.m., s.c. intrauterin	Infektionen des Respirations-, Urogenital- oder Gastrointestinaltraktes Endometritis, Nachgeburtsverhalten	3 1
Oxacillin	Stapenor Salbe [®] , Masteet [®]	intramammär	Mastitis	6
Cloxacillin	Penivet [®] , Eumacid [®] , Cloxacillin 1000 [®]	intramammär	Mastitis	6
Benzylpenicillin, Nafcillin und Streptomycin	Nafpenzal T [®]	intramammär	Trockensteller, Mastitis	Anwendung 35 Tage vor Geburtsstermin: 5Tage nach Beginn der Laktation, Anwendung innerhalb der 35 Tage vor Geburtsstermin: 40Tage

Fortsetzung Tabelle 1

Präparat	Herstellername	Applikationsart	Indikation	Wartezeit Milch in Tagen
Cefoperazon	Peracef [®]	intramammär	Behandlung klinischer Mastitiden während der Laktation.	4
Cefazolin	Celiodocin [®]	intramammär	Behandlung klinischer und subklinischer Mastitiden	5
Cefalexin-Monohydrat	Rilexine 200 LC [®]	intramammär	Akute oder chronische Mastitis bei laktierenden Kühen, hervorgerufen durch Cephalalexin-empfindliche Keime	3
Cefapirin-Benzathin	Metricure [®]	intrauterin	Behandlung der subakuten und chronischen Endometritis, verursacht durch Cefapirin-empfindliche Bakterienarten	0
Ceftiofur-Natriumsalz	Excenel [®]	i.m.	Atemwegserkrankungen, Panaritium	1
Ceftiofur-Hydrochlorid	Excenel [®] RTU	s.c.	Atemwegserkrankungen, Panaritium	0
Cefquinom	Cobactan [®] 2,5%, Cobactan [®] LC Cobactan [®] DC	i.m. intramammär intramammär	bakterielle Infektionen des Respirationstraktes, Infektionen der Klauen subklinische und klinische Mastitiden durch Staphylokokkenspezies oder Streptokokkenspezies subklinische Mastitiden durch Staphylokokkenspezies oder Streptokokkenspezies während Trockensteherperiode	2 5 49 Tage nach Anwendung bei einer Trockensteherperiode von weniger als 7 Wochen; 1 Tag nach Abkalbung bei einer Trockensteherperiode von über 7 Wochen
Cefaceftril	Ubrocef Euterinjektor	intramammär	Mastitis	6

i.m.: intramuskulär, s.c.: subcutan

2.2 Auswirkungen von Antibiotika in der Milch für den Verbraucher

2.2.1 Gesundheitliche Risiken

Die wichtigste Nebenwirkung von β -Laktam-Antibiotika sind allergische Reaktionen nach Applikation therapeutischer Dosen. Es kann zu lokalen (Hautreizungen) oder generalisierten Symptomen (z.B. anaphylaktischer Schock) unterschiedlichen Schweregrades kommen, die innerhalb weniger Minuten oder aber erst nach Tagen und Wochen auftreten können. Die Pathophysiologie der anaphylaktischen Reaktion beruht auf der Erkennung des Hapten-Träger-Komplexes durch IgE-Antikörper. Sowohl Penicilline wie Cephalosporine sind Haptene, die kovalent an Proteine binden können und dadurch zu einer Modifikation derselben führen, die eine Erkennung durch das Immunsystem möglich macht. Die Entwicklung einer Immunantwort kann unbemerkt verlaufen und erst bei einer Reexposition klinisch manifest werden oder aber bereits beim ersten Kontakt eine Reaktion hervorrufen (NEFTEL und PICHLER, 2006). Bei bereits sensibilisierten Personen können auch sehr niedrige Wirkstoffkonzentrationen bereits zu einer allergischen Reaktion führen (DEWDNEY et al., 1991). Durch Aufnahme von mit Penicillin kontaminierter Milch kam es bei extrem sensiblen Personen zur Auslösung systemisch allergischer Reaktionen (MINKIN und LYNCH, 1969; WICHER et al., 1969; TERPLAN und ZAADHOF, 1975).

Die Weltgesundheitsorganisation WHO warnte im September 2001 vor der weltweiten Zunahme der Antibiotika-Resistenz. Die Zunahme antimikrobieller Resistenzen führt zu einer Einschränkung der Therapiemöglichkeiten von Infektionskrankheiten und zieht erhebliche zusätzliche gesundheitsökonomische Belastungen nach sich (MARRE et al., 2002). Bakterien können die Wirkung der Antibiotika durch verschiedene Resistenzmechanismen aufheben oder schwächen. Einer der wichtigsten Resistenzmechanismen gegenüber β -Laktam-Antibiotika besteht in der Bildung von Enzymen wie Penicillinasen oder Cephalosporinasen, sogenannten β -Laktamasen, die die Ringstruktur der β -Laktam-Antibiotika aufspalten und diese somit unwirksam machen (MEALEY, 2001; BUSH und SYKES, 1983; THEURETZBACHER, 1998).

2.2.2 Technologische Risiken

Im Molkereibetrieb eingesetzte, produktionsnotwendige Milchsäurebakterien, z. B. *Streptococcus salivarius* subspecies *thermophilus* oder *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* können bereits durch geringe Rückstände antibiotisch wirksamer Substanzen in Ihrer Aktivität gehemmt werden. Diese gezielt eingesetzten Keime reagieren zum Teil empfindlicher auf Antibiotika-Rückstände als der zu deren Nachweis eingesetzte Testkeim, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* des gebräuchlichsten mikrobiologischen Hemmstoffnachweises, dem Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) (BEYER, 1986).

Ein Ausfall der Milchsäurebakterien führt zu einer ungenügenden Säuerung bei der Joghurt- und Käseherstellung, zum anderen kann es dadurch zur Vermehrung der gegen Penicillin unempfindlichen coliformen Keime kommen, die eine produktive Verwertung des hergestellten Käses verhindern (BEYER, 1986), wodurch erhebliche wirtschaftliche Schäden entstehen können (TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

2.3 Gesetzliche Bestimmungen und Richtlinien

Das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) dient dem Verbraucher durch Vorbeugung gegen eine oder Abwehr einer Gefahr für die Gesundheit. Es untersagt nach § 10 Absatz 1 vom Tier stammende Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die bei diesem Tier nicht angewendet werden dürfen oder festgesetzte Höchstmengen überschreiten. Dabei verweist das LFGB auf die Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 vom 26. Juni 1990 (in ihrer jeweils gültigen Fassung), die in den Anhängen I – IV ein Verzeichnis der Stoffe aufführt, für die Höchstmengen für Rückstände festgelegt sind, für die keine Höchstmengen für Rückstände gelten, für die vorläufige Höchstmengen oder für die keine Höchstmengen festgelegt wurden.

Zum Schutze des Verbrauchers wurden bereits vor rund 20 Jahren EU-weit Höchstmengen für Arzneimittelrückstände (Maximum Residue Limit, MRL) festgesetzt. In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgelistet, für die durch Anhang I, Verzeichnis der pharmakologisch wirksamen Stoffe, Höchstmengen für Rückstände festgesetzt sind (VO (EWG) 2377/90. Diese Verordnung wurde zwar kürzlich durch die VO (EG) 470/2009 aufge-

hoben, die Anhänge 1-4 der VO (EWG) 2377/90 werden jedoch unverändert übernommen, so dass bezüglich der β -Laktam-Antibiotika keine Änderung der Rechtslage gegeben ist.

Tabelle 2: Rückstände (MRL) für β -Laktam-Antibiotika in Kuhmilch (nach VO (EWG) 2377/90 bzw. VO (EG) 470/2009)

Pharmakologisch wirksamer Stoff	Höchstmenge in $\mu\text{l/kg}$
Benzylpenicillin	4
Ampicillin	4
Amoxicillin	4
Oxacillin	30
Cloxacillin	30
Dicloxacillin	30
Nafcillin	30
Cefoperazon	50
Cefazolin	50
Cefalexin	100
Cefapirin	60
Ceftiofur	100
Cefquinom	20
Cefalonium	20
Cefacetril	125

Wenn einem Lebensmittel lieferndem Tier Stoffe mit pharmakologischer Wirkung verabreicht wurden, die als Arzneimittel zugelassen, registriert oder als Futtermittel-Zusatzstoffe zugelassen sind, dann ist der Milcherzeuger zur Einhaltung der festgesetzten Wartezeiten verpflichtet.

Die Kontrolle der Anlieferungsmilch auf Hemmstoffe ist durch die Milchgüteverordnung geregelt. Eine Untersuchung zur Feststellung von Hemmstoffen hat nach § 2 Absatz 3 Milchgüteverordnung monatlich mindestens zweimal zu erfolgen. Die Untersuchungen erfolgen nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Hemmstoffpositive Milchproben führen zu Sanktionen für den Milchlieferanten. Die Milchgüteverordnung sieht bei hemmstoffpositiven Proben einen Abzug von 5 Cent pro kg Milch für den betreffenden Monat vor (MILCHGÜTEVERORDNUNG VOM 9.07.1980, zuletzt geändert am 30.10.2003). Bei einer Häufigkeit von 0,1 – 0,2 % werden jährlich einige Tausend Hemmstoffabzüge erteilt.

Stichprobenuntersuchungen von Konsummilch und Milcherzeugnissen auf antimikrobiell wirksame Substanzen erfolgen im Rahmen des nationalen Rückstandskontrollplans für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Dieser dient allgemein der Untersuchung von lebenden Nutztieren, Fleisch, Milch, Eier und Honig auf Rückstände unerwünschter Stoffe, die z. B. durch die illegale Anwendung verbotener oder nicht zugelassener Stoffe in das Lebensmittel gelangen können. Die Kontrolle des vorschriftsmäßigen Einsatzes zugelassener Tierarzneimittel sowie die Belastung durch Umweltkontaminanten sind ebenfalls Bestandteil der Zielsetzung des Rückstandskontrollplans. Dieses Programm wird in der Europäischen Union nach einheitlichen Maßstäben durchgeführt und in Deutschland vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) koordiniert. Der Rückstandskontrollplan wird jährlich vom BVL erstellt und enthält für jedes Bundesland genaue Vorgaben über Anzahl der Proben und Methodik der Probenuntersuchung. Die rechtlichen Rahmenbedingungen für den nationalen Rückstandskontrollplan finden sich in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 und der Richtlinie 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997.

Das Arzneimittelgesetz verpflichtet nach § 58 u.a. den Tierhalter (also den Milcherzeuger) zu einem verantwortungsvollen und ordnungsgemäßen Umgang mit Tierarzneimitteln. Zusätzlich verpflichtet die Verordnung zur Änderung der Verordnung über Nachweispflichten für Arzneimittel, die zur Anwendung bei Tieren bestimmt sind, und zur Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (Verordnung "Bestandsbuch"), den Halter von Lebensmittel liefernden Tieren ein Bestandsbuch zu führen, in dem die Anwendung von Arzneimitteln einzutragen sind, die nicht zum Verkehr außerhalb von Apotheken freigegeben sind. Tierärzte haben bei der Anwendung oder Abgabe von Arzneimitteln bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, einen Arzneimittel-Anwendungs- und Abgabebeleg mit Eintragung der einzuhaltenden Wartezeit auszufüllen.

2.4 Charakterisierung der in die Untersuchung einbezogenen Substanzen

2.4.1 β -Laktam-Antibiotika

2.4.1.1 Allgemeines

Zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika gehören die Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame. In der Veterinärmedizin werden hauptsächlich die Penicilline und die Cephalosporine eingesetzt. Ihren Namen verdanken die β -Laktam-Antibiotika der β -Laktam-Ringstruktur ihres molekularen Grundgerüsts (Abbildung 1).

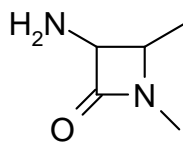


Abbildung 1: β -Laktam-Ringstruktur

2.4.1.2 Penicilline

Das erste Penicillin wurde von Alexander Flemming im Jahre 1929 durch Beobachtung der antibakteriellen Wirkung eines zufällig auf einer Blutplatte gewachsenen Schimmelpilzes entdeckt, welchen er nach der Gattung des Schimmelpilzes (*Penicillium notatum*) Penicillin nannte. Weitere Forschungen von Florey, Chain, Hestley und Abraham zur Gewinnung von Penicillin aus Penicillin-Kulturen ermöglichten seinen breiten Einsatz während des Zweiten Weltkrieges. 1945 bekamen Flemming, Florey und Chain als Begründer der modernen Antibiotikatherapie den Nobelpreis (KINAST, 2008).

Das Grundgerüst der Penicilline bildet die fermentativ hergestellte 6-Aminopenicillansäure (6-APS) (Abbildung 2).

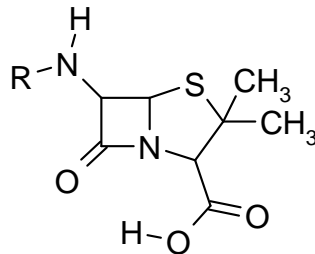


Abbildung 2: Grundstruktur der Penicilline: 6-Aminopenicillansäure

Eine Einteilung der Penicilline kann in natürliche Penicilline und semisynthetische Penicilline erfolgen. Zu den natürlichen Penicillinen zählen das Benzylpenicillin (Penicillin G) und das Oralpenicillin (Phenoxymethylpenicillin) Penicillin V. Die semisynthetischen Penicilline können in Abhängigkeit von ihrer Penicillinaseresistenz und ihres Wirkungsspektrums weiter eingeteilt werden. Man unterscheidet Penicillinase-stabile Penicilline (Isoxazolympenicilline), Aminopenicilline mit erweitertem Wirkungsspektrum und Breitspektrumpenicilline (Acylaminopenicilline (Ureidopenicilline) und Carboxyopenicilline). Bei den heute in der Veterinärmedizin zugelassenen Penicillinen handelt es sich bis auf das Benzylpenicillin (Penicillin G) um semisynthetische Verbindungen (Abbildung 3).

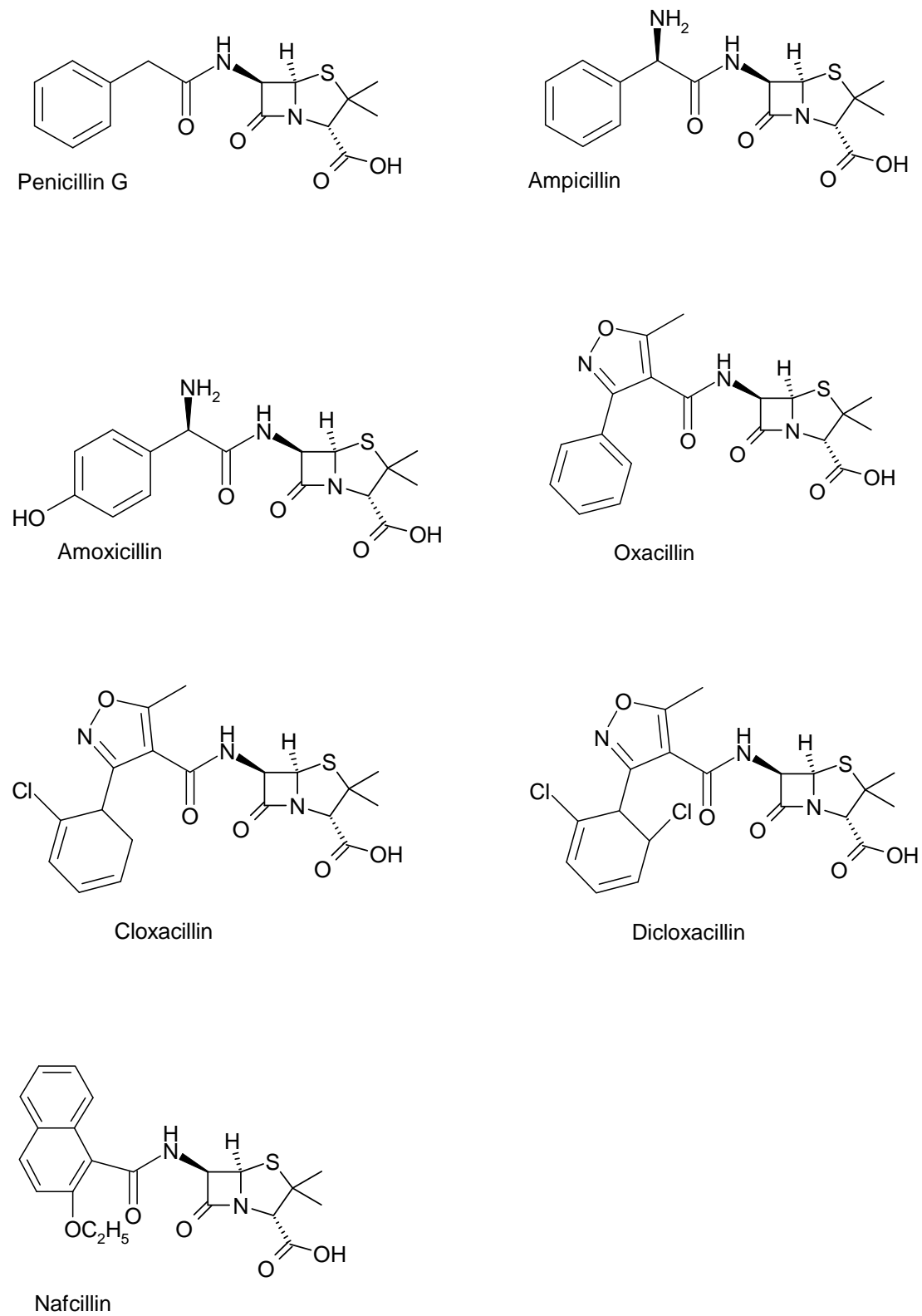


Abbildung 3: Strukturformeln einiger zur Anwendung bei laktierenden Kühen zugelassener Penicilline

Die Wirkung des Penicillin G erstreckt sich überwiegend auf grampositive Bakterien und einige gramnegative Kokken. Penicillin G wird durch Penicillinasen inaktiviert. Penicillin V zeichnet sich gegenüber Penicillin G durch eine erhöhte Säurefestigkeit aus, dadurch ist es zur oralen Gabe geeignet. Aminopenicilline (Ampicillin und Amoxicillin) sind besonders gegenüber gramnegativen Keimen wirksam. Die Isoxazolylpenicilline (z.B. Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Flucloxacillin, Methicillin) werden vorwiegend bei durch Staphylokokken und Streptokokken bedingten Infektionen eingesetzt. Ihre Penicillinase-Stabilität erhalten sie durch Abschirmung des β -Laktamringes durch die Substituente Aryl-isoxazolyl, sie sind somit auch gegen die Penicillinasen von *Staphylococcus aureus* stabil und werden daher auch „Staphylokokken-Penicilline“ genannt. Die Breitspektrumpenicilline, Acylaminopenicilline (z.B. Mezlocillin, Azlocillin und Piperacillin) und Carboxylpenicilline (z.B. Ticarcillin, Temocillin und Carindacillin), zeichnen sich durch ein weiteres Wirkungsspektrum gegen gramnegative Keime aus. In der Veterinärmedizin sind derzeit keine Vertreter dieser Klasse zugelassen.

2.4.1.3 Cephalosporine

Das erste Cephalosporin wurde 1945 von Brotzu aus Kulturen von *Cephalosporium acremonium* isoliert. Cephalosporine besitzen anstelle des fünfgliedrigen Thiazolidinringes der Penicilline einen sechsgliedrigen Dihydrothiazinring. Die Cephalosporine leiten sich aus der 7-Aminocephalosporansäure ab (Abbildung 4) und werden heute hauptsächlich synthetisch hergestellt.

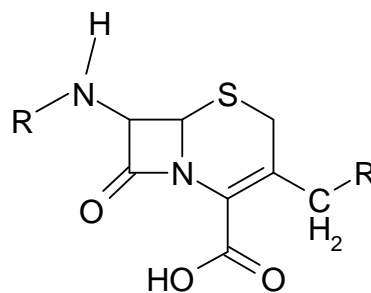


Abbildung 4: Grundstruktur der Cephalosporine: 7-Aminocephalosporansäure

Eine Einteilung der Cephalosporine kann zum einen in oral applizierbare und intravenös zu verabreichende Gruppen erfolgen, zum anderen werden sie pharmakologisch in 4 Generationen eingeteilt, abhängig von ihrem in-vitro-Wirkungsspektrum (nach ADAM und CHRIST, 1987; KROKER et al., 1996; KROKER 1999; HORNISH und KOTARSKI, 2002; PLUMB, 2002).

Vertreter der ersten Generation, die in den 60er und 70er Jahren eingeführt wurden, besitzen Wirksamkeit gegen grampositive Keime; gegen gramnegative Keime ist das Wirkungsspektrum nur sehr begrenzt. Sie sind parenteral (z.B. Cefalothin, Cefazolin, Cefacetril) oder oral (Cefaloglycin, Cefalexin, Cefapirin) applizierbar und besitzen nur eingeschränkte β -Laktamase-Stabilität. Ende der 70er Jahre standen die Cephalosporine der zweiten Generation zur Verfügung, die eine breite Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Erreger besitzen. Des Weiteren weisen sie gegenüber der ersten Generation eine bessere β -Laktamaseresistenz auf, die sich durch ihre Struktur erklärt, die Acylgruppe des Cefamandols und die Oximeter-Gruppe. Zu ihnen zählen z.B. Cefamandol, Cefoxitin, Cefaclor, Cefuroxim, Loracarbef und Cefotetan. Zur dritten Generation werden Cefotaxim, Cefoperazon, Ceftriaxon, Ceftiofur und Cefixim gerechnet. Die hervorragende Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien geht mit einem leichten Aktivitätsverlust gegenüber grampositiven Bakterien einher. Charakteristische Strukturmerkmale dieser Cephalosporinklasse sind die Oxyimino-Gruppe (Abbildung 5), die für die gute β -Laktamase-Stabilität verantwortlich gemacht wird, sowie der Aminothiazolyl-Ring, die zusammen die Aminothiazolyl-methoxyimino-Gruppe bilden. Cephalosporine der vierten Generation (z.B.: Cefepim und Cefquinom) stellen die neuesten Vertreter dieser Klasse dar. Sie besitzen ebenfalls eine Aminothiazolyl-methoxyimino-Gruppe, zusätzlich zu den Cephalosporinen der dritten Generation aber eine quaternäre Aminogruppe mit permanent positiver Ladung, die für das erweiterte Wirkungsspektrum speziell gegen gramnegative Bakterien verantwortlich ist (Abbildung 5).

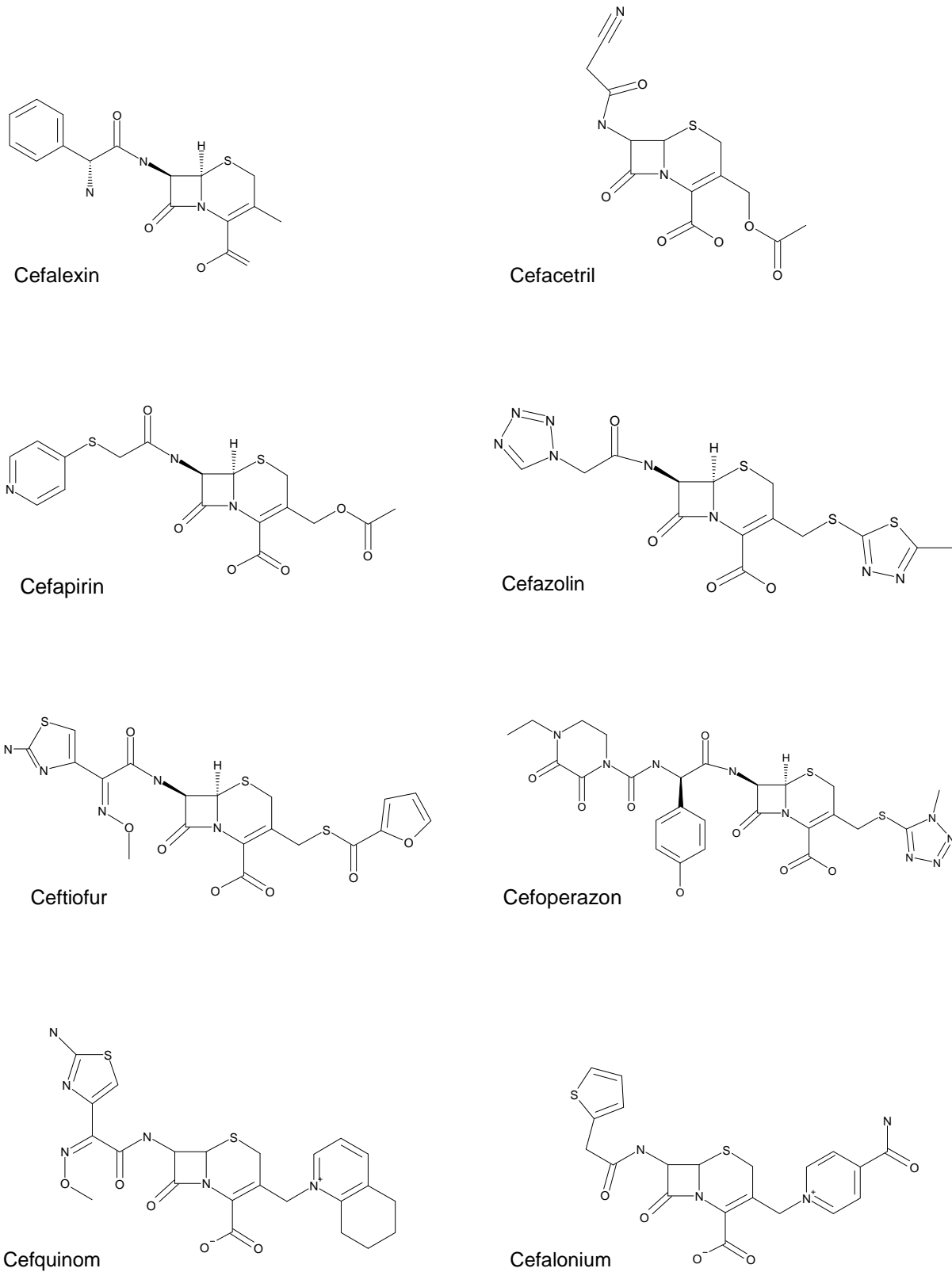


Abbildung 5: Strukturformeln einiger zur Anwendung bei laktierenden Kühen zugelassenen Cephalosporine

2.4.1.4 Wirkungsmechanismen

Penicilline und Cephalosporine haben prinzipiell den gleichen Wirkungsmechanismus, sie greifen die bakteriellen Peptidoglykansynthetasen (Mureinsynthetasen) der Zellwand an, die in eukaryotischen Zellen nicht vorhanden sind. Diese Enzyme fungieren hauptsächlich als Transpeptidasen, die Glykanstränge durch kurze Peptidbrücken quervernetzen und so das Peptidglykangerüst aufbauen und stabilisieren. Aufgrund ihrer hohen Affinität für β -Laktame werden diese Transpeptidasen auch als penicillinbindende Proteine (PBPs) bezeichnet (LESSEL, 1996). Durch die Reaktion der β -Laktam-Bindung mit dem aktiven Zentrum der Enzyme werden diese in ihrer Funktion blockiert. Daraus resultieren Deformierungen der Bakterien oder so große Defekte in der Zellwand, dass der hohe osmotische Druck im Inneren der Bakterien die Zytoplasmamembran durch den Defekt vorstülpt, bis sie zerreißt und es zur Zellyse kommt.

2.4.1.5 Wirkungsspektrum

Die antibakterielle Aktivität und das Wirkungsspektrum der β -Laktam-Antibiotika sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Um an ihren Zielort, die Mureinsynthetasen an der Oberfläche der Zytoplasmamembran, zu gelangen, müssen die β -Laktam-Antibiotika die bakterielle Zellwand und den periplasmatischen Raum passieren. Die Durchlässigkeit der Zellwand gramnegativer Stäbchenbakterien für β -Laktam-Antibiotika ist veränderlich und es kann zur Entwicklung von Mutanten mit stark reduzierter Zellwandpermeabilität kommen. Weiterhin kann es durch Mutationen zu Veränderungen der penicillinbindenden Proteine kommen, zu denen die β -Laktam-Antibiotika nur noch eine reduzierte oder keine Affinität mehr haben. Der häufigste Resistenzmechanismus ist die Produktion von β -Laktamasen, die als Penicillinasen oder als Cephalosporinasen wirken und zu einer hydrolytischen Spaltung der β -Laktam-Bindung führen und somit das Antibiotikum inaktivieren (GEISEL und SCHMITZ, 2000; KROKER et al., 1996; MASON und KIETZMANN, 1999). Durch gleichzeitige Gabe von β -Laktamase-Inhibitoren (z.B. Clavulansäure) kann die Resistenz von Bakterien gegen β -Laktamase-labile Penicilline überwunden werden. Diese β -Laktamase-Inhibitoren üben keine oder kaum direkte antibakterielle Aktivität aus, besitzen aber die Fähigkeit bestimmte β -Laktamasen zu blockieren (STAHLMANN und LODE, 2001).

2.4.2 β -Laktamasen

β -Laktamasen sind Enzyme, die in der Lage sind, den β -Laktam-Ring der β -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren und diese unter Bildung von Penicillosäure zu inaktivieren (Abbildung 6). Beschrieben wurden diese Enzyme bereits 1940 von Abraham und Chain (ABRAHAM et al., 1940). Zurzeit sind mehr als 340 verschiedene Varianten dieser Enzyme bekannt (BUSH, 2001). Ihre Zahl ist in den letzten Jahren stark angestiegen (MEDEIROS, 1997).

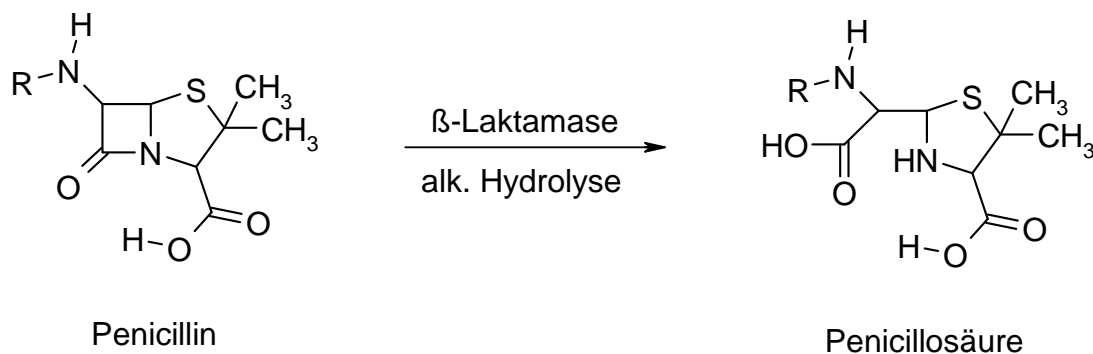


Abbildung 6 : Hydrolyse des β -Laktam-Ringes durch die β -Laktamase

Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz schlug Ambler 1980 eine Klassifizierung der Enzyme vor, die so genannten Ambler-Klassen A-D (AMBLER, 1980). Einige β -Laktamasen besitzen eine Seringruppe (Ambler-Klasse A, C und D), bei anderen β -Laktamasen steht Zink anstelle von Serin im aktiven Zentrum (Metalloenzyme, Ambler-Klasse B). β -Laktamasen der Gruppe A hydrolysieren vorwiegend Penicilline; sie werden daher auch als Penicillinasen bezeichnet und sind hauptsächlich auf Plasmiden kodiert. Zur Gruppe C zählen Enzyme, die bevorzugt Cephalosporine inaktivieren und hauptsächlich auf Chromosomen, teilweise aber auch auf Plasmiden gefunden werden, die Cephalosporinasen. Gruppe D beinhaltet vor allem Oxacillinasen, die als Substrat Oxacilline bevorzugen, teilweise aber auch auf andere β -Laktam-Gruppen übergreifen.

Eine andere Klassifizierung der β -Laktamasen erfolgt nach ihrer Funktionalität (Tabelle 3, BUSH et al., 1995). Teilweise ergeben sich Ähnlichkeiten zwischen der Einteilung von Ambler und den Hauptgruppen von Bush. β -Laktamasen der Gruppe 1 entsprechen der Ambler-

Klasse C. Hauptvertreter sind die AmpC- β -Laktamasen, die durch β -Laktamase-Inhibitoren nicht gehemmt werden können und entweder chromosomal oder auf einem Plasmid kodiert sind. Bei den chromosomalen AmpC erfolgt eine weitere Unterscheidung in nicht-induzierbare Expression und durch die Anwesenheit von β -Laktamen induzierbare Enzyme. Die Gruppe 2 der Bush-Einteilung ist in mehrere Untergruppen aufgeteilt. In Untergruppe 2a werden durch Clavulansäure (Abbildung 7) hemmbare Penicillinasen eingeordnet, z.B. die bei *Staphylococcus aureus* vorkommende β -Laktamase BlaZ. Enzyme der Gruppe 2b gehören zu den Breitspektrum- β -Laktamasen, sie sind durch β -Laktamase-Inhibitoren hemmbar. Zur Untergruppe 2be zählen die Extended Spectrum β -Laktamasen, die durch Aminosäureaustausch so verändert sind, dass sich das katalytische Spektrum der β -Laktamasen erweitert (WIEGAND, 2003). Gruppe 2br leitet sich von Enzymen der Gruppe 2b ab, wird aber im Gegensatz zu diesen nicht von Clavulansäure gehemmt. Untergruppe 2c zeichnet sich durch Penicillinasen aus, die Carbenicillin gut, Cloxacillin oder Oxacillin schlecht spalten, eine Hemmung durch Clavulansäure ist möglich. Enzyme der Gruppe 2d können ebenfalls Carbenicillin spalten, besitzen jedoch höhere Hydrolyseraten gegenüber Cloxacillin und Oxacillin als Untergruppe 2c, auch werden sie durch Clavulansäure nicht so stark gehemmt wie die übrigen Enzyme der Hauptklasse 2. Cephalosporinasen, die sich im Gegensatz zu Gruppe 1 durch Clavulansäure hemmen lassen, werden in Untergruppe 2e eingeordnet. Enzyme der Untergruppe 2f sind in der Lage Carbapeneme zu hydrolysieren. Gruppe 3 umfasst die Metalloenzyme, die im aktiven Zentrum ein bis zwei Zink-Ionen besitzen. Sie können durch Metallionen-Chelatoren wie z.B. EDTA in ihrer Aktivität gehemmt werden. Zu den Metallo-Enzymen zählen die Metallo-Carbapenemasen, unter denen funktional zwischen Enzymen mit einem breiten hydrolytischen Spektrum und denen mit einer ausgeprägten Präferenz für Carbapeneme unterschieden werden kann. In die Gruppe 4 werden Enzyme eingeordnet, die noch nicht genau definiert sind und nicht in die anderen Klassen passen (SCHNEIDER, 2004).

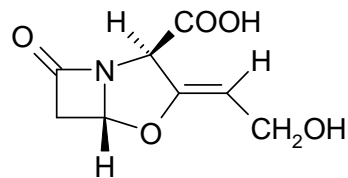
Die genaue Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Penicillinase ist leider nicht bekannt. Eine genaue Einordnung in eine der ersten drei Gruppen des Schemas nach Bush ist somit nicht möglich. Die verwendete Penicillinase kam deshalb zur Anwendung, weil sie seit Jahrzehnten die gebräuchliche Penicillinase in Untersuchungslabors der Milchkontrolle ist.

Tabelle 3: Einteilung der β -Laktamasen nach BUSH et al., 1995

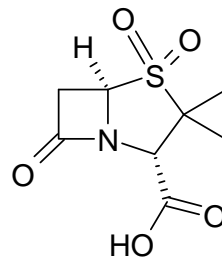
Funktionelle Hauptgruppen	Untergruppen	Substratspezifität	Hemmung durch Clavulansäure	repräsentative Enzyme
1		Cephalosporine	-	AmpC Enzyme gramnegativer Bakterien, MIR-1 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>), CMY-1, -2, (<i>Klebsiella pneumoniae</i>), FOX-1, FOX-2, ACC-1, u.a.
2	2a	Penicilline	+	Penicillinasen grampositiver Bakterien TEM-1, -2 (Enterobakterien, Haemophilus, Gonokokken), SHV-1 (Enterobakterien)
	2b	Penicilline, Cephalosporine	+	
	2be	Penicilline, Schmalspektrum-Cephalosporine, Cephalosporine mit erweiterem Spektrum, Monobactame	+	
	2br	Penicilline	-	TEM-30 bis TEM-36, TRC-1 (<i>E. coli</i>)
	2c	Penicilline, Carbenicillin	+	PSE-1, PSE-3 und PSE-4 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	2d	Penicilline, Cloxacillin	+	OXA-1 bis -11 (Enterobakterien), PSE-2 = OXA 10 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	2e	Cephalosporine	+	induzierbare Cephalosporinasen von <i>Proteus vulgaris</i>
	2f	Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme	+	NMC-A von <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 von <i>Serratia marcescens</i>
3		Viele β -Laktame einschließlich Carbapeneme	-	Metallo (ZN-) Enzyme: L1 von <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA von <i>Bacteroides fragilis</i>
4		keine genaue Definition, umfasst unzureichend beschriebene β -Laktamasen	-	Penicillinase von <i>Burkholderia cepacia</i>

2.4.3 β -Laktamase-Inhibitoren

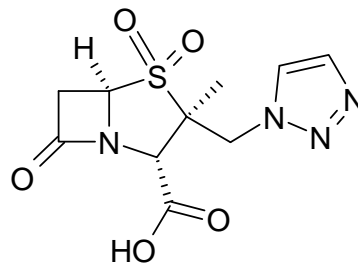
β -Laktamasen können durch β -Laktamase-Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt werden. Zu den β -Laktamase-Inhibitoren zählen Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam (Abbildung 7). Diese Inhibitoren besitzen nur eine schwache eigene antibakterielle Wirksamkeit (THEURETZBACHER, 2004), können aber sowohl Plasmid- als auch chromosomal-kodierte Enzyme inhibieren. Sie besitzen selbst β -Laktam-Struktur, dadurch kann es zur Bindung des Inhibitors an das Enzym kommen, die β -Laktamase wird irreversibel gehemmt. Die Empfindlichkeit der einzelnen β -Laktamasen gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren ist unterschiedlich (Tabelle 3).



Clavulansäure



Sulbactam



Tazobactam

Abbildung 6: Strukturformeln einiger β -Laktamase-Inhibitoren

2.5 Nachweisverfahren für β -Laktam-Antibiotika in Milch

Trotz Einführung der ersten Rückstandshöchstmengen nach EU-Verordnung 2377/90 vor fast 20 Jahren existieren noch immer keine routinetauglichen Verfahren, die es ermöglichen, alle mit MRL belegten β -Laktamantibiotika gleichzeitig und mit ausreichender Empfindlichkeit quantitativ nachzuweisen. Daher wurden verschiedene „integrierte Nachweis- und Differenzierungssysteme“ unter Nutzung verschiedener Methoden bzw. Methodenkombinationen, entwickelt (HEESCHEN und SUHREN, 1996; HOLTKÖTTER et al., 2002; SUHREN, 2002; TEUFEL, 1998), die stufenweise durchgeführt werden. Abbildung 7 zeigt ein Analysesystem mit dem Schwerpunkt des Nachweises von β -Laktam-Antibiotika, wie es an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität seit Jahren eingesetzt wird (HOLTKÖTTER et al., 2002).

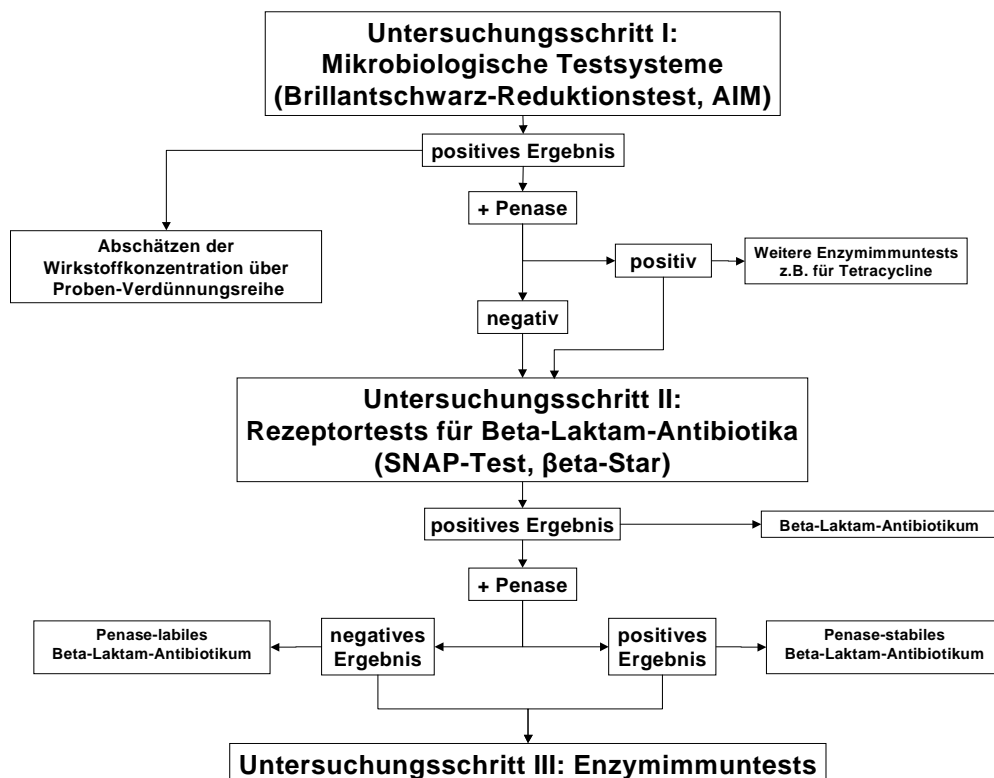


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Durchführung des integrierten Nachweissystems für Hemmstoffe in Milch (nach Holtkötter et al., 2002)

Hemmstoffpositive Milch wird mittels eines mikrobiologischen Verfahrens (Agardiffusionsverfahren, BRT) untersucht, jeweils mit und ohne Zusatz von Penicillinase. Zeigt die Probe nach der β -Laktamase-Behandlung ein positives Ergebnis, so wird davon ausgegangen, dass es sich entweder um ein falsch-positives Ergebnis, ein nicht der β -Laktam Gruppe zugehöriges Antibiotikum oder ein β -Laktamase stabiles β -Laktam-Antibiotikum handelt. In diesen Fällen wird die Milchprobe einer Hitzebehandlung (10 Minuten im Wasserbad bei 80-90°C) unterzogen, zum Ausschluss originärer Hemmstoffe, sowie mit Para-Aminobenzoensäure (PABA) versetzt, um das Vorhandensein von Sulfonamiden zu testen. Des Weiteren können Enzymimmuntests für z.B. Tetrazykline oder Streptomycin durchgeführt werden. Zeigt sich im BRT nach Behandlung mit β -Laktamase jedoch ein negatives Ergebnis, so werden im zweiten Untersuchungsschritt Rezeptor-Schnelltests (SNAP Beta-Laktam Test, β ta s.t.a.r.) zur Bestätigung der Resultate durchgeführt. Die Durchführung der Schnelltests erfolgt ebenfalls nach Behandlung der Probe mit β -Laktamase und liefert dadurch weitere Hinweise auf das mögliche Vorkommen β -Laktamase stabiler Antibiotika. Im dritten Untersuchungsschritt werden dann nach Bestätigung des Vorhandenseins von β -Laktam-Antibiotika Enzymimmuntests zur Identifizierung und Quantifizierung der fraglichen Substanz durchgeführt (Abbildung 8).

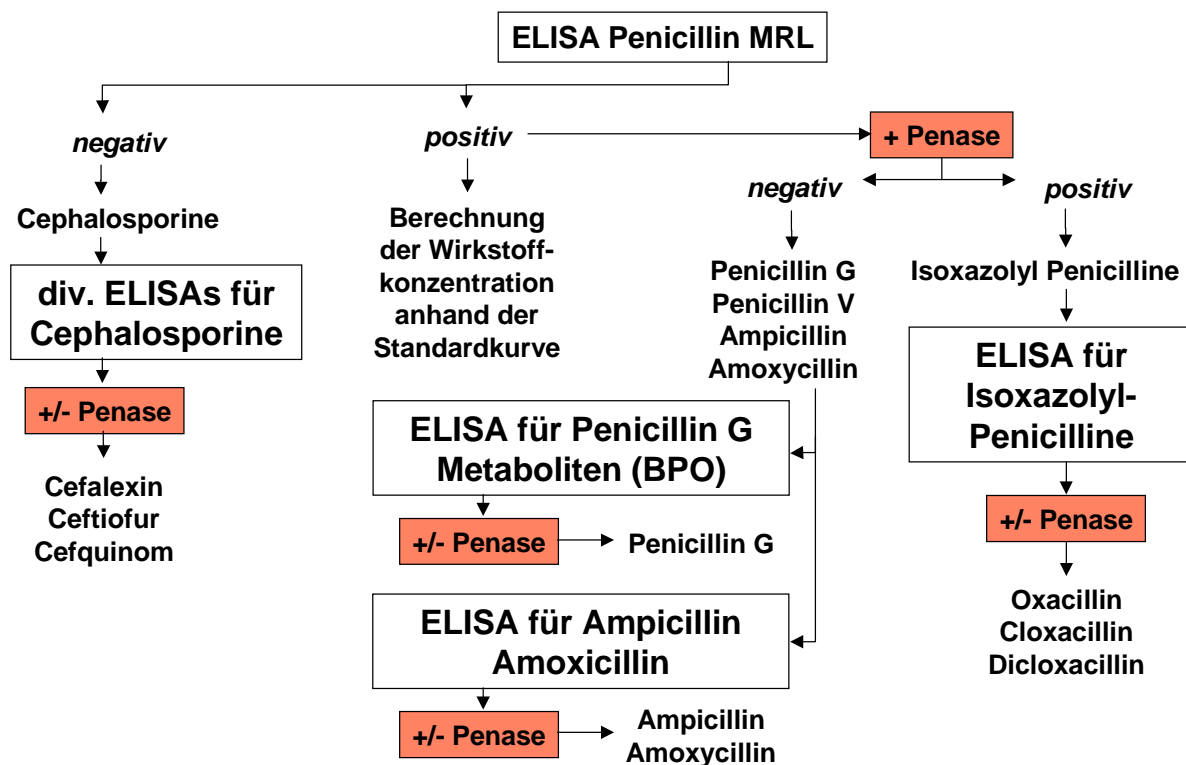


Abbildung 8: Typische Testsequenz beim Einsatz der Enzymimmuntests zur Identifizierung von β -Laktam-Antibiotika im integrierten Analysesystem (nach KERP et al., 2004)

Die zu untersuchende Milchprobe wird zunächst mittels des gruppenspezifischen EIA für Penicilline untersucht. Zeigt sich hier ein positives, nach der Behandlung mit Penase jedoch ein negatives Resultat, kann nun mit Hilfe weiterer EIAs zwischen Penicillin G/V (BPO-EIA) und Ampicillin/Amoxicillin (Ampicillin/Amoxicillin-EIA) unterschieden werden. Die jeweilige Wirkstoffkonzentration errechnet sich anhand der Standardkurve. Ergibt sich nach der Penase-Behandlung noch immer ein positives Ergebnis, so wird im Folgenden der EIA zum Nachweis und zur Quantifizierung von Isoxazolyl-Penicillinen durchgeführt.

Milchproben, die in den Rezeptor-Schnelltests positive, im gruppenspezifischen EIA für Penicilline aber negative Ergebnisse ergeben, werden als „Cephalosporinhaltig“ eingestuft. Mit Hilfe weiterer EIAs kann zwischen Cefalexin, Cefotiofur und Metaboliten und Cefquinom unterschieden werden.

2.5.1 Mikrobiologische Verfahren für β -Laktam-Antibiotika

Das Testprinzip mikrobiologischer Hemmstofftests basiert auf der Hemmung des Wachstums oder der Stoffwechselaktivität empfindlicher Testkeime durch Hemmstoffe (MITCHELL et al., 1998). Häufig verwendete Testorganismen sind *Bacillus (B.) stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *B. megaterium* und *Streptococcus thermophilus*. Je nach Testformat kann das Vorhandensein von Hemmstoffen anhand der Größe der Hemmhöfe (Blättchentest) oder der Farbe zugesetzter Indikatoren (z.B. Redoxindikator Brillantschwarz, pH-Indikator Bromkresolpurpur) beurteilt werden.

Eine genauere Klassifizierung der Rückstände ist durch verschiedene Zusätze zum Nährboden bedingt möglich (GEDEK, 1977; SUHREN und HEESCHEN, 1996). So ist durch Zugabe von β -Laktamase eine Unterscheidung von Penicillinen und Nicht-Penicillinen möglich. Die Zugabe von Paraaminobenzoessäure (PABA) kann zur Antagonisierung von Sulfonamiden genutzt werden.

Ein großer Vorteil der mikrobiologischen Testsysteme liegt in ihren geringen Kosten und der einfachen Durchführung. Es können schnell große Probenzahlen untersucht werden und die Testsysteme besitzen ein relativ breites Wirkspektrum (SUHREN und HEESCHEN, 1996; SUHREN und REICHMUTH 1998b). Eine genaue Unterscheidung zwischen Tierarzneimittel-

rückständen und anderen Hemmstoffen ist schwierig (MEYER-BURGMAYER, 1980; CARLSSON und BJÖRCK, 1987).

2.5.1.1 Agardiffusionsverfahren

Zu den Agardiffusionstests gehören unter anderem die in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach LFGB § 64 beschriebenen Methoden zur Untersuchung von Sammelmilch auf Hemmstoffe (L 01.01-5, L 01.00-6), zwei Suchtests für Antiinfektiva in Milch (L01.00-11, L 01.00-62) und ein Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in roher und wärmebehandelter Milch (L 01.00-51).

Bei der Methode L 01.01-5, dem Brillantschwarzreduktionstest (BRT), wird die zu untersuchende Probe auf ein mit dem Testkeim *B. stearothermophilus* var. *calidolactus* beimpftes Agarmedium aufgebracht. Der Testkeim bewirkt eine Reduktion des im Agar enthaltenen Brillantschwarz. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag von violett nach gelb. Befinden sich in der zu untersuchenden Probe Hemmstoffe, die das Wachstum oder die Stoffwechselaktivität des Testkeimes behindern, so erfolgt kein oder nur ein geringer Farbumschlag.

Entwickelt wurde der Brillantschwarzreduktionstest von KRAACK und TOLLE (1967). In den folgenden Jahren wurde er bezüglich Spezifität und Sensitivität weiterentwickelt (CARLSSON und BJÖRCK, 1987; ZAADHOF et al., 1997; ZOMER und LIEU, 1996). Der BRT kann von verschiedenen Herstellern bezogen werden: Chr. Hansen GmbH, Lübeck; AIM München; DSM Food Specialities, Dortmund. Tabelle 4 gibt die Nachweisempfindlichkeiten des BRT-Hemmstofftests und des MRL-Suchtest der AIM-Testsysteme für die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika an.

Tabelle 4: Nachweisgrenzen für ausgewählte Antibiotika in µg/kg im BRT-Hemmstofftest und im MRL-Suchtest (Herstellerangaben, AIM, 2008)

Antibiotikum	Hemmstofftest µg/kg	MRL-Suchtest µg/kg
Benzylpenicillin	2 - 3	1,5 - 2
Ampicillin	2 - 3	2 - 3
Amoxicillin	2 - 3	2 - 3
Oxacillin	10 - 20	5 - 10
Cloxacillin	20 - 30	10 - 20
Dicloxacillin	10 - 20	5 - 10
Nafcillin	10 - 15	5 - 10
Cefoperazon	25 - 50	20 - 30
Cefazolin	10 - 25	10 - 25
Cefalexin	200 - 300	100 - 200
Cefapirin	3 - 5	4 - 5
Ceftiofur	50 - 100	50 - 100
Cefquinom	100 - 200	80 - 100
Cefalonium	10 - 20	10 - 15
Cefacetil	keine Angabe des Herstellers	keine Angabe des Herstellers

Methode L 01.00-11 ist ein Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch, MRL-Suchtest. Dieser Test ist eine Modifikation des BRT-Hemmstofftests. Verschiedene Antiinfektiva wie z. B. die Sulfonamide können im Test anders reagieren als die bisher übliche Positiv-Kontrolle (4 ng Penicillin G). Daher werden bei der Auswertung des MRL-Suchtests alle Proben, die nicht die gelbe Reaktionsstufe der Negativ-Kontrolle aufweisen, als positiv bzw. verdächtig eingestuft.

Eine weitere mikrobiologische Methode (L 01.00-6) ist der Blättchentest. Hierbei werden mit der zu untersuchenden Probe getränkte Blättchen auf einen mit *B. stearothersophilus* beimpften Nährboden aufgebracht. Vorhandene Hemmstoffe können in den Agar diffundieren und das Keimwachstum hemmen. Es kommt zur Ausbildung eines Hemmhofes, dessen Durchmesser von Konzentration und Art des Hemmstoffes abhängt.

Der Delvotest (DSM, Dortmund) stellt einen Röhrendiffusionstest dar. Er ist in verschiedenen Versionen erhältlich als Delvotest P, entwickelt 1970, als Delvotest SP, der im Unterschied zum Delvotest P ein größeres Substanzspektrum aufweist und etwas länger inkubiert wird, als Delvotest Cow Test und als Delvotest MCS, dem keine Nährstofftablette mehr zugesetzt werden muss, da der Agar bereits mit Nährstoffen angereichert ist (NEAVES, 1999).

Alle vier Testsysteme beruhen auf demselben Wirkungsprinzip. Bei Abwesenheit von Hemmstoffen und nach Zusatz von Milchprobe und Nährstofftablette (Ausnahme Delvotest MCS) kommt es zum Wachstum des Testkeims *B. stearothermophilus* und dadurch zur Bildung von sauren Stoffwechselprodukten, die einen Farbumschlag des pH-Indikators Bromkresolpurpur von violett nach hellgelb bewirken.

Der Charm AIM-96 (Charm Sciences Inc, USA) stellt eine Weiterentwicklung des Charm Farm Tests dar und verwendet im Unterschied zu den bisher erläuterten Testsystemen ein flüssiges Nährmedium.

Auf dem gleichen Testprinzip wie die bisher beschriebenen Testsysteme beruhen auch der Copan P&S Test (Firma Chr. Hansen, Horsholm Dänemark) sowie der Valio T101 (Valio Ltd.; Helsinki, Finnland), der als Testkeim *Streptococcus thermophilus* verwendet.

2.5.1.2 Rezeptorbindungstests

Das Wirkungsprinzip der Rezeptorbindungstests beruht auf der Verwendung spezifischer Bindungsproteine (mikrobielle Rezeptorproteine bzw. –enzyme, Antikörper) für β -Laktam-Antibiotika, deren tatsächliche Natur und Gewinnung Firmengeheimnisse darstellen (MEIER, 2008). In einer Milchprobe enthaltene Hemmstoffe können das Bindungsprotein entweder irreversibel oder in Konkurrenz mit einem an die Fettphase gebundenen entsprechenden Analyten blockieren. Voraussetzung für eine Bindungsreaktion ist eine erhöhte Temperatur (45 - 64°C), die durch Verwendung eines speziellen Heizblocks ermöglicht wird. Das Messsignal entsteht entweder durch die Hemmung der Enzymaktivität oder durch die Messung des an die Fettphase gebundenen Bindungsproteins und ist visuell auswertbar sowie instrumentell messbar. Bei einigen Tests ist auch nur eine rein visuelle oder rein instrumentelle Auswertung möglich. Ein Vorteil der Rezeptorbindungstests liegt in ihrer schnellen und einfachen Durchführung, da die meisten dieser Testsysteme als „Schnelltests“ vorliegen und ein Ergebnis in der Regel schon nach wenigen Minuten (2 – 15 min) abgelesen werden kann. Als Nachteil sind die mögliche Beeinflussbarkeit der Testergebnisse durch pH-Wert, Zellzahl oder Keimzahl, die teilweise unzureichende Testsensitivität und der apparative Aufwand (Heizblock) zu sehen (ANDREW et al., 1997; KROLL, 2000). Eine Substanzdifferenzierung ist mit den Rezeptorbindungstests nicht möglich, da die Bindung an die Rezeptoren gruppenspezifisch erfolgt. In Tabelle 5 sind einige Beispiele mikrobieller Schnelltestsysteme aufgeführt.

Tabelle 5: Rezeptorbindungstests für β -Laktam-Antibiotika: verschiedene Schnelltestsysteme mit Herstellerangabe und Detektionsprinzip

Schnelltest (Firma)	Detektionsprinzip
β ta s.t.a.r. 25 (Chr. Hansen GmbH)	Rezeptorprotein- Goldkonjugat
β ta s.t.a.r. 100 (Chr. Hansen GmbH)	Rezeptorprotein- Goldkonjugat
Der SNAP Beta-laktam Test (IDEXX GmbH, Wörrstadt)	Rezeptorprotein- Enzymkonjugat
Charm II Test (Charm Sciences Inc., USA)	Radioaktiv markierte Antibio- tika
Charm Test (Erhältlich als Charm MRL BL Test, Charm SL 6 Test, Charm SL BL β -lactam test (Charm Sciences Inc., USA)	Rezeptorprotein- Goldkonjugat
Charm Rosa (Charm Sciences Inc., USA)	Rezeptorprotein- Goldkonjugat
Delvo-X-Press (DSM Food Specialities, Delft, Niederlande, Vertrieb in Deutschland durch DSM Food Specialities, Dort- mund)	Rezeptorprotein- Enzymkonjugat
Delvo-X-Press β L-II (DSM Food Specialities, Delft, Niederlande, Vertrieb in Deutschland durch DSM Food Specialities, Dortmund)	Rezeptorprotein- Enzymkonjugat

Der Penzym Test (UCB-Bioproducts S.A., Belgien; Vertrieb in Deutschland durch Chr. Hansen GmbH, Nienburg) ist ein enzymatischer Test. Er ist in zwei Varianten erhältlich, „Penzym“ und „Penzym S“. Das Testprinzip beruht auf der Inaktivierung eines Enzyms (DD-Carboxypeptidase, ein Penicillin bindendes Protein) durch β -Laktam-Antibiotika. Sind in einer mit dem Enzym inkubierten Milchprobe β -Laktam-Antibiotika enthalten, so binden diese irreversibel an das Enzym, welches dadurch inaktiviert wird. Dabei hängt der Grad der Inaktivierung mit der in der Probe vorhandenen Antibiotika-Konzentration zusammen (NAVRATILOVA, 2008). Nach Zugabe eines Reagenziengemisches kommt es durch verbleibendes aktives Enzym zur Freisetzung von Alanin, welches durch D-Aminosäureoxidase in Pyruvat unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid enzymatisch abgebaut wird. Wasserstoff-

peroxid oxidiert einen organischen Farbstoff unter Bildung einer Farbverbindung (MORETAIN und FROGER, 1995). Dieser Farbumschlag wird visuell anhand einer mitgelieferten Farbskala ausgewertet.

2.5.2 Physikalisch-chemische Verfahren

Zu den physikalisch-chemischen Verfahren zählen colorimetrische, spektrophotometrische, elektroforetische und chromatographische Methoden. Diese Methoden werden aufgrund ihrer hohen Kosten für die Analysegeräte, der Anforderungen an hochqualifiziertes Personal und einer intensiven Probenaufbereitung in der Routinediagnostik nicht eingesetzt. Als Bestätigungstest kommt den chromatographischen Verfahren die größte Bedeutung zu (BOBBIT und NG, 1992; SHAIKH und MOATS, 1993).

2.5.3 Immunologische Verfahren

Das Wirkungsprinzip immunologischer Verfahren beruht auf der Fähigkeit von Antikörpern, spezifische Moleküle (Antigene) zu erkennen und zu binden. Zur Messung der Antikörper-Antigen-Reaktion werden markierte Reagenzien (Antigen oder Antikörper) verwendet. Als Marker kommen radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) sowie lumineszierende oder fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenzimmunoassay, FIA) zum Einsatz (EKINS, 1985; MÄRTLBAUER, 1993; GARCIA et al., 1997). Ein großer Vorteil dieser Testsysteme besteht darin, dass eine Möglichkeit zur Identifizierung und Quantifizierung von Rückständen gegeben ist. Enzymimmunologische Tests eignen sich als Screening-Verfahren zur Untersuchung größerer Probenmengen (STRASSER, 2003). Kommerziell erhältlich sind Immuntestkits z.B. „CITE-Probe“ von IDEXX oder „LacTek“ von IDETEK.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Ethanol (absolut, zur Synthese)	(Merck KGaA, 8.18760)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)

3.1.2 β -Laktam-Antibiotika und Penicillinase

Amoxicillin	(Sigma Chemie GmbH, A-8523, Lot Nr. 108H0647)
Ampicillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, A-9518, Lot Nr. 100K1042)
Cefacetril-Natriumsalz	(Novartis, 97120050Z1)
Cefalexin-Hydrat	(Sigma Chemie GmbH, C-4895, Lot Nr. 99H0521)
Cefalonium	(Schering-Plough, Bray)
Cefapirin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8270, Lot Nr. 70K0644)
Cefazolin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-5020, Lot Nr. 20K0846)
Cefoperazon-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-4292, Lot Nr. 120K1043)
Cefquinom-Sulfat	(Intervet Innovation GmbH)
Ceftiofur-Natriumsalz	(Pharmacia Upjohn)
Cloxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, Lot Nr. 7352B)
Dicloxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, D-9016, Lot Nr. 69H0841)
Nafcillin-Natriumsalz-Monohydrat	(Sigma Chemie GmbH, N-3269, Lot Nr. 102K0486)
Oxacillin-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, O-1002, Lot Nr. 110K1041)
Penicillin G-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, Pen-Na, Lot Nr. 99H0522)
Penicillinase „Penase Concentrate“	(Difco, USA; Vertrieb in Deutschland durch BD; 234610)

3.1.3 Puffer und Lösungen

Natronlauge 1mol/l (NaOH)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS: 6,79 g NaCl, 1,47 g Na₂HPO₄, 0,43 g KH₂PO₄,
aqua dest. add 1l)

Salzsäure 1 mol/l (HCl)

3.1.4 Brillantschwarz-Reduktionstest

BRT-Mikrotiterplatten-Testsystem, Testkeim: *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, bezogen von AIM (Analytik in Milch, GmbH)

3.1.5 Geräte

Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic)
Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Wasserbad:GFL	(MAGV GmbH)
Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen	
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)

3.1.6 Probenmaterial

Vollmilch, 3,8 % Fettgehalt, pasteurisiert und homogenisiert, aus dem Einzelhandel. Die Freiheit von Hemmstoffen wurde jeweils mittels BRT überprüft.

3.1.7 Datenverarbeitung

ELISA-Autoreader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH, Crailsheim)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Software: RIDAWIN Version 1.38	(R-Biopharm AG, Deutschland)
Magellan Software (2.5)	(Tecan Austria GmbH)

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellen der Antibiotika-Stammlösungen und -Gebrauchslösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen (1 mg/ml) wurden jeweils ca. 4-10 mg des entsprechenden Antibiotikums unter Berücksichtigung des Salzanteils bzw. Reinheitsgrades in ein Glasfläschchen eingewogen und durch Zugabe eines entsprechenden Volumens PBS (pH 7,3) gelöst.

Zur Berücksichtigung des Salzanteils wurden folgende Faktoren verwendet:

Penicillin G: (mg Einwaage x 0,94)
Ampicillin: (mg Einwaage x 0,94)
Amoxicillin: kein Salzanteil
Oxacillin: (mg Einwaage x 0,95)
Cloxacillin: (mg Einwaage x 0,95)
Dicloxacillin: (mg Einwaage x 0,95)
Nafcillin: (mg Einwaage x 0,95)
Cefoperazon: (mg Einwaage x 0,97)
Cefalexin: (mg Einwaage x 0,93)
Cefapirin: (mg Einwaage x 0,95)
Cefazolin: (mg Einwaage x 0,95)
Ceftiofur: kein Salzanteil
Cefquinom: kein Salzanteil
Cefalonium: kein Salzanteil
Cefacetril: (mg Einwaage x 0,94)

Die Stammlösung des Antibiotikums Cefalonium wurde durch Zugabe gleicher Mengen PBS und Ethanol sowie anschließender Verweildauer von 25 Minuten im Ultraschallbad hergestellt.

Weitere Verdünnungen (jeweils 1:10) der Stammlösungen mit Phosphatpuffer dienten zur Herstellung der Gebrauchslösungen. Stammlösungen sowie Gebrauchslösungen wurden an jedem Untersuchungstag neu hergestellt, mit Ausnahme von Ceftiofur, hier wurde die Stammlösung bis zu max. 4 Wochen aufbewahrt.

3.2.2 Probenherstellung

Zur Probenherstellung wurde Milch (pasteurisierte, homogenisierte Vollmilch) mit den Antibiotika-Testlösungen in Konzentrationen von 4 ng/ml bis 1000 ng/ml dotiert. Die getesteten Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums sind in Tabelle 6 aufgeführt.

3.2.3 Herstellung der Penicillinase-Konzentrationen

Laut Herstellerangaben wies die verwendete Penicillinase eine spez. Aktivität von 20.000 LU/ml/min auf (= 10.000.000 IU/ml/min; 1 LU bezeichnet die Menge an Penicillinase, die 59,3 IU an Penicillin G-Natriumsalz pro Stunde bei einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 25 °C inaktiviert). Zur Durchführung der Aktivitätsexperimente wurde das Penicillinase-Konzentrat entweder unverdünnt verwendet (20-200 µl Konzentrat-Zugabe) oder zur Herstellung niedriger Penicillinase-Konzentrationen kurz vor Verwendung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,3) so verdünnt, dass die gewünschte Penicillinasemenge in 20 µl Verdünnungslösung enthalten war. Die der jeweiligen Antibiotikum-Lösung zugesetzte Penicillinase-Wirkstoffmenge ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Antibiotika-Konzentrationen und zugesetztes Volumen des Penicillinase-Konzentrates

Antibiotikum	Konzentrationen in ng/ml	Zusatz Penicillinase- Konzentrat		Resultierende Enzym- konzentration	
		µl/ml		IU/ml	
		von	bis	von	bis
Penicillin G	10	0,02	- 0,05	200	- 500
	100	0,044	- 0,08	444	- 800
	1000	0,09	- 0,2	870	- 2.000
Ampicillin	10	0,02	- 0,044	200	- 444
	100	0,057	- 0,14	571	- 1.428
	1000	0,08	- 0,2	800	- 2.000
Amoxicillin	10	0,025	- 0,045	250	- 456
	100	0,05	- 0,2	541	- 2.000
	1000	0,08	- 0,4	800	- 4.000
Oxacillin	30	1	- 3,33	10.000	- 33.333
	100	2	- 10	20.000	- 100.000
	1000	1,33	- 20	13.333	- 200.000
Cloxacillin	30	3,33	- 20	33.333	- 200.000
	100	10	- 60	100.000	- 600.000
	1000	20	- 200	200.000	- 2.000.000
Dicloxacillin	30	4	- 20	40.000	- 200.000
	100	20	- 1200	200.000	- 12.000.000
	1000	20	- 2000	200.000	- 20.000.000
Nafcillin	30	0,2	- 0,5	2.000	- 5.000
	100	0,36	- 0,67	3.636	- 6.667
	1000	0,67	- 4	6.667	- 40.000
Cefoperazon	50	0,1	- 0,286	1.000	- 2.857
	100	0,2	- 0,67	2.000	- 6.667
	1000	0,67	- 4	6.667	- 40.000
Cefazolin	50	10	- 60	100.000	- 600.000
	100	20	- 100	200.000	- 1.000.000
	1000	20	- 100	200.000	- 1.000.000
Cefalexin	500	20	- 200	200.000	- 2.000.000
	1000	20	- 200	200.000	- 2.000.000

Fortsetzung Tabelle 6

Antibiotikum	Konzentrationen in ng/ml	Zusatz Penicillinase- Konzentrat		Resultierende Enzym- konzentration	
		µl/ml		IU/ml	
		von	bis	von	bis
Cefapirin	60	10	- 100	100.000	- 1.000.000
	100	10	- 100	100.000	- 1.000.000
	1000	20	- 200	200.000	- 2.000.000
Ceftiofur	100	2	- 20	20.000	- 200.000
	500	20	- 100	200.000	- 1.000.000
	1000	20	- 120	200.000	- 1.200.000
Cefquinom	1000	20	- 200	200.000	- 2.000.000
Cefalonium	20	0,1	- 4	1.000	- 40.000
	100	1	- 20	10.000	- 200.000
	500	1	- 40	10.000	- 400.000
	1000	1	- 60	10.000	- 600.000
Cefacetril	100	6,67	- 140	66.667	- 1.400.000
	500	20	- 200	200.000	- 2.000.000
	1000	20	- 200	200.000	- 2.000.000

3.2.4 Ermittlung der minimalen Penicillinase-Konzentration zur Inaktivierung der Antibiotika

Zur Herstellung der Testlösungen wurde 1 ml Probe mit 20 µl Penicillinase-Konzentrat bzw. mit PBS verdünntem Penicillinase-Konzentrat versetzt. Zur genauen Ermittlung der Inaktivierungs-Dosis wurden Serien-Verdünnungsreihen im relevanten Penicillinase-Konzentrationsbereich (0,02 µl/ml bis 200 µl/ml) hergestellt. Die mit Penicillinase-Konzentrat bzw. mit verdünntem Penicillinase-Konzentrat versetzte Probe wurde bei Raumtemperatur (22 °C) 30 min inkubiert.

3.2.5 Ermittlung des Einflusses der Inkubationszeit

Der Einfluss der Inkubationszeit wurde durch die Inkubation der Testlösungen folgender Antibiotika bei Raumtemperatur (22 °C) für jeweils 30 min, 60 min und 120 min ermittelt: Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Ceftiofur, Cefoperazon.

3.2.6 Ermittlung des Einflusses der Inkubationstemperatur

Zur Ermittlung des Einflusses der Inkubationstemperatur wurden die Testlösungen folgender Antibiotika bei 4 °C im Kühlschrank, bei 22 °C Raumtemperatur sowie bei 40 °C und 60 °C im Wasserbad für 30 min inkubiert: Penicillin G, Cloxacillin, Nafcillin, Ceftiofur, Cephoperazon.

3.2.7 Durchführung des Brillantschwarz-Reduktionstests

Von den inkubierten Testlösungen sowie von Positiv- und Negativkontrollansätzen (Milch mit 4 ng/ml Penicillin G bzw. hemmstofffreie Milch) wurden im Vierfachansatz jeweils 100 µl pro Kavität der Testplatten zupipettiert. Das Mikrotiter-Tablett wurde mit einer dafür bestimmten Klebefolie verschlossen. Die Bebrütung erfolgte im Wasserbad bei 65 °C über ca. 2,5 Stunden (\pm 15 min), bis bei den Negativkontrollen ein deutlicher Farbumschlag von lila nach gelb zu erkennen war. Anschließend wurde die Klebefolie entfernt und die Milch mit Hilfe von Aqua dest. aus den jeweiligen Kavitäten ausgewaschen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt.

3.2.8 Auswertung

Die BRT-Platten wurden jeweils instrumentell und visuell ausgewertet.

Die instrumentelle Testauswertung erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (Messwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm). Die Auswertung erfolgte anhand der Mittelwerte der für die Positiv- und Negativ-Kontrolle gemessenen Extinktionswerte unter Verwendung folgender Formel:

$$(E_{pr}-E_{nk})/(E_{pk}-E_{nk}) \times 100$$

E_{pr} = Extinktionswert Probe

E_{nk} = Extinktionswert Negativkontrollen (Mittelwert)

E_{pk} = Extinktionswert Positivkontrollen (Mittelwert)

Proben, die einen Extinktionsunterschied zur Negativkontrolle von 60% und mehr im Vergleich zum Extinktionsunterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle aufwiesen, wurden als positiv bewertet.

Photometrische Auswertung:

1. Negatives Ergebnis:

relative Absorption < 60%

2. Positives Ergebnis:

Relative Absorption \geq 60%

Die visuelle Auswertung entsprach der in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG beschriebenen Methode L 01.01-5 (Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch).

Visuelle Auswertung:

1. Negatives Ergebnis

Die Farbintensität der Kavität entspricht der Negativkontrolle

2. Positives Ergebnis

Die Farbintensität der Kavität weicht von der Negativkontrolle ab.

4 Ergebnisse

4.1 Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zur vollständigen Inaktivierung verschiedener β -Laktam-Antibiotika

Abhängig von der jeweiligen Penicillinase-Konzentrat-Dosis (Tabelle 7 - 21) konnten mit Ausnahme von Cefalexin und Cefquinom alle getesteten β -Laktam-Antibiotika vollständig inaktiviert werden. Zwischen der instabilsten Verbindung (Penicillin G) und den Penicillinase-stabilsten Verbindungen lag im Hinblick auf den erforderlichen Penicillinase-Zusatz ein Faktor von fast 1000. Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin ließen sich im Bereich von 100ng/ml mit einer Penicillinase-Dosis von 0,06 - 0,09 μ l/ml vollständig inaktivieren. Nafcillin und Cefoperazon waren in einer mit 100 mg/ml dotierten Probe mit 0,3 – 0,6 μ l/ml Penicillinase inaktivierbar. Ein etwas höherer Penicillinase-Zusatz wurde bei Oxacillin benötigt, die Dosis lag zwischen 2,5 und 3,3 μ l/ml. Cefalonium wurde durch 4,0 – 5,0 μ l/ml Penicillinase-Zugabe inaktiviert. Ceftiofur benötigte zwischen 10,0 und 20,0 μ l/ml zur vollständigen Inaktivierung. Cloxacillin wurde durch 20,0 bis 40,0 μ l/ml Penicillinase bei einer mit 100 ng/ml dotierten Probe vollständig inaktiviert. Dicloxacillin, Cefazolin, Cefapirin und Cefacetril waren im Bereich von 100ng/ml mit 40,0 bis 60,0 μ l/ml Penicillinase vollständig inaktivierbar. Cefalexin war in einer Konzentration von 100 ng/ml, Cefquinom war in einer Konzentration von 100 ng/ml und 500 ng/ml im BRT nicht sicher nachweisbar. In Konzentration von 1000 ng/ml konnten beide Antibiotika auch mit der höchsten getesteten Penicillinase-Dosis (200 μ l Penicillinase-Konzentrat/ml) nicht inaktiviert werden.

Bei der Auswertung wurde visuelle und photometrische Auswertung nebeneinander gestellt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen visueller und photometrischer Auswertung konnte nicht festgestellt werden. Die photometrische Auswertung ergab geringfügig niedrigere Konzentrationen zur vollständigen Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika.

Tabelle 7: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Penicillin G**

Penicillin G (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicilli- nase-Konzentrates zur vollständigen Inak- tivierung (µl/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswertung	Photometrische Auswertung
		10	3	364 – 444	333 – 444
100	3	606 – 800	588 – 800	0,06 – 0,08	0,06 – 0,08
1000	3	1.176 – 1.333	1.176	0,12 – 0,13	0,12

Tabelle 8: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Ampicillin**

Ampicillin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur vollstän- digen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswertung	Photometrische Auswertung
		10	3	364 – 444	333 – 444
100	4	909 – 1.000	800 – 909	0,09 – 0,1	0,08 – 0,09
1000	3	2.000	2.000	0,2	0,2

Tabelle 9: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Amoxicillin**

Amoxicillin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur vollständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur vollstän- digen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswertung	Photometrische Auswertung
10	3	308 – 351	267 - 308	0,03 – 0,04	0,03
100	3	800 – 1.000	800	0,08 – 0,1	0,08
1000	3	1.176 – 2.000	1.176 – 1.333	0,12 – 0,2	0,12 – 0,13

Tabelle 10: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Oxacillin**

Oxacillin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
30	3	20.000 – 25.000	14.286 – 25.000	2,0 - 2,5	1,4 – 2,5
100	3	33.333 – 50.000	25.000 – 33.333	3,3 - 5,0	2,5 – 3,3
1000	3	100.000	100.000	10,0	10,0

Tabelle 11: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cloxacillin**

Cloxacillin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
30	3	66.667	50.000	6,7 – 10,0	5,0 – 6,7
		– 100.000	– 66.667		
100	3	200.000	200.000	20,0 – 40,0	20,0 – 40,0
		– 400.000	– 400.000		
1000	3	400.000	400.000	40,0 – 60,0	40,0 – 60,0
		– 600.000	– 600.000		

Tabelle 12: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Dicloxacillin**

Dicloxacillin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
30	3	200.000	200.000	20 – 40	20 – 40
		– 400.000	– 400.000		
100	3	400.000	400.000	40	40
		60.000	60.000		
1000	3	– 1.000.000	– 1.000.000	60 – 100	60 – 100

Tabelle 13: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Nafcillin**

Nafcillin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (μ l/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
30	3	3.333 – 4.000	2.222 – 2.857	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3
100	4	4.444 – 6.667	4.000 – 5.714	0,4 – 0,7	0,4 – 0,6
1000	3	11.765 – 13.333	11.111 – 13.333	1,2 – 1,3	1,1 – 1,3

Tabelle 14: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefoperazon**

Cefoperazon (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (μ l/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
50	3	1.333 – 2.222	1.000 – 2.000	0,1 – 0,2	0,1 – 0,2
100	3	4.000 – 5.000	3.077 – 4.000	0,4 – 0,5	0,3 – 0,4
1000	3	14.286 – 20.000	14.286 – 20.000	1,4 – 2,0	1,4 – 2,0

Tabelle 15: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefazolin**

Cefazolin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur vollstän- digen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswertung	Photometrische Auswertung
30	3	400.000	400.000	40	40
100	3	400.000 – 600.000	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0	40,0 – 60,0
1000	4	600.000 – 800.000	600.000 – 800.000	60,0 – 80,0	60,0 – 80,0

Tabelle 16: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefalexin**

Cefalexin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur vollstän- digen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
100	3		Konzentration im BRT nicht nachweisbar		
500	3	>2.000.000	>2.000.000	>200	>200
1000	3	>2.000.000	>2.000.000	>200	>200

Tabelle 17: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefapirin**

Cefapirin (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
60	4	200.000 – 400.000	200.000 – 400.000	20 – 40	20 – 40
100	3	400.000	400.000	40	40
1000	3	400.000 – 600.000	400.000 – 600.000	40 – 60	40 – 60

Tabelle 18: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Ceftiofur**

Ceftiofur (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
100	3	200.000	100.000 – 200.000	20	10 – 20
500	3	600.000	600.000 800.000	60	60
1000	3	1.000.000	– 1.000.000	100	80 – 100

Tabelle 19: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefquinom**

Cefquinom (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Peni- cillinase-Konzentrates zur vollständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
		100	3	Konzentration im BRT nicht nachweisbar	
500	3	Konzentration im BRT nicht nachweisbar			
1000	3	>2.000.000	>2.000.000	>200	>200

Tabelle 20 Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefalonium**

Cefalonium (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (IU/ml)		Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung (µl/ml)	
		Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
		20	3	20.000	6.667 – 10.000
100	3	40.000 – 66.667	40.000 – 50.000	4,0 – 6,7	4,0 – 5,0
1000	3	100.000	100.000	10	10

Tabelle 21: Minimal erforderliche Penicillinase-Zugabe zu künstlich kontaminierter Milch zur vollständigen Inaktivierung von **Cefacetril**

Cefacetril (ng/ml)	n	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates zur voll- ständigen Inaktivierung		Minimal erforderlicher Zusatz des Peni- cillinase-Konzentrates zur vollständigen Inaktivierung	
		(IU/ml)		(µl/ml)	
		Visuelle Aus- wertung	Photometrische Auswertung	Visuelle Auswer- tung	Photometrische Auswertung
100	3	600.000 1.200.000	400.000	60	40
500	3	– 1.400.000	1.000.000 1.000.000	100 – 140	100
1000	3	1.400.000	– 1.400.000	140	100 – 140

Abbildung 9 gibt eine prozentuale Übersicht über die zur vollständigen Inaktivierung der einzelnen β -Laktam-Antibiotika nötige Penicillinase-Dosis wieder. Zum Vergleich wurden die mit 1000 ng/ml gespikten Proben herangezogen, da alle verwendeten β -Laktam-Antibiotika in diesem Bereich untersucht wurden. Cefalexin und Cefquinom wurden in dieses Diagramm nicht mit einbezogen, da bei beiden Antibiotika eine Inaktivierung durch die verwendete Penicillinase nicht möglich war. Cefacetril wird in Abbildung 9 mit 100 % angegeben, da bei diesem Antibiotikum die höchste Penicillinase-Dosis zur vollständigen Inaktivierung nötig war. Penicillin G benötigte im Vergleich zu Cefacetril nur 0,09 % der für Cefacetril nötigen Penicillinase-Dosis.

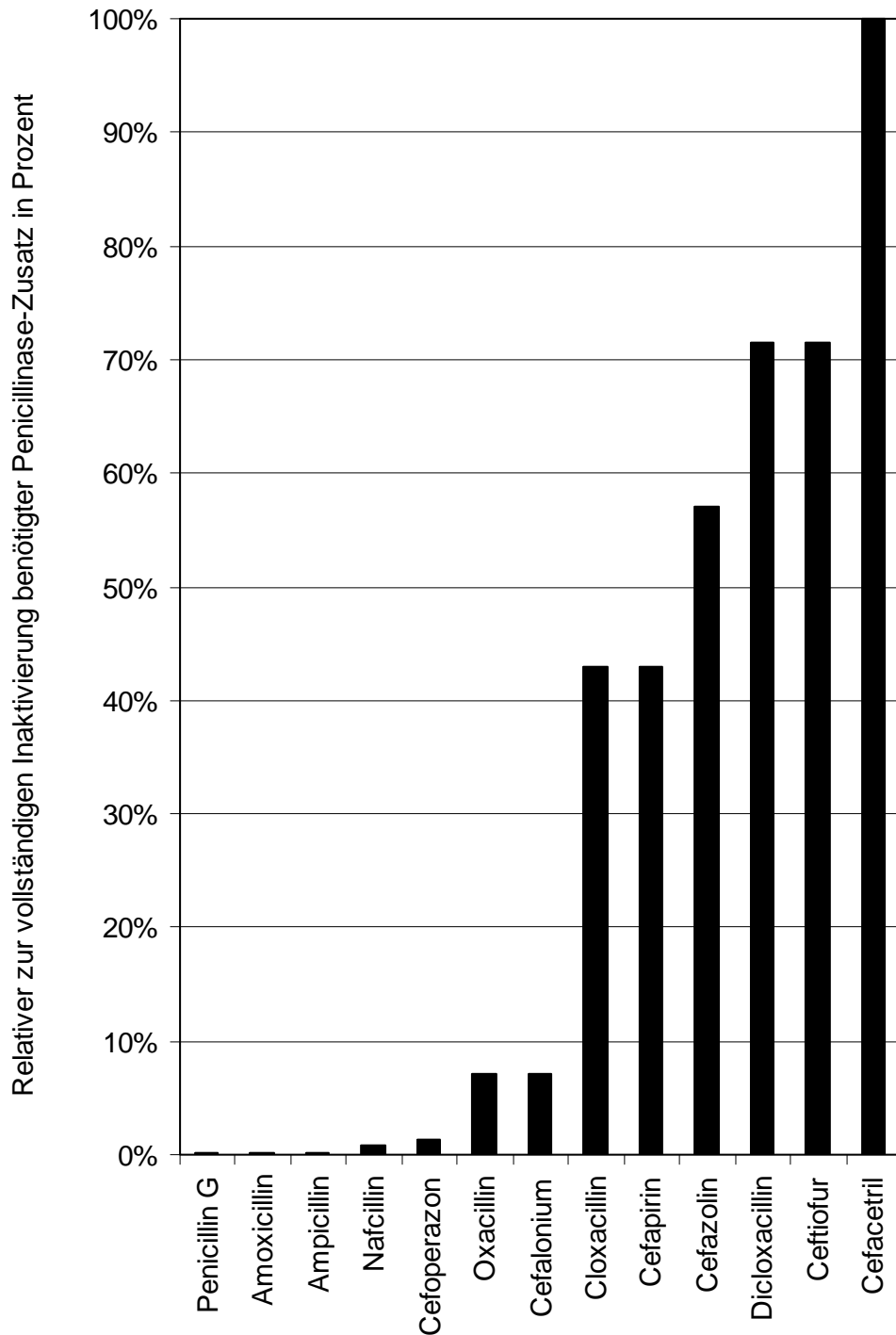


Abbildung 9: Vergleich der relativen Unterschiede zwischen β -Laktam-Antibiotika bezüglich des zur vollständigen Inaktivierung benötigten Penicillinase-Zusatzes, bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 22°C. Der relativ Penicillinase-stabilste Wirkstoff Cefacetril wurde dabei als 100% festgelegt. Zwei weitere Wirkstoffe (Cefquinom, Cefalexin), die durch die verwendete Penicillinase auch mit der am höchsten getesteten Dosis nicht inaktiviert werden konnten, sind in der Grafik nicht dargestellt.

4.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die vollständige Inaktivierung verschiedener β -Laktam-Antibiotika

Die Ergebnisse der Verlängerung der Inkubationszeit von 30 Minuten auf 60 Minuten und 120 Minuten sind in den Tabellen 22 bis 26 dargestellt. Bei längerer Einwirkzeit der Penicillinase war eine geringere Penicillinase-Dosis zur vollständigen Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika nötig, sie verringerte sich um ein Drittel, teilweise sogar um die Hälfte. Eine Ausnahme stellte Ceftiofur dar, bei diesem β -Laktam-Antibiotikum zeigte sich kein oder nur ein geringer Einfluss der Inkubationsdauer auf die notwendige Penicillinase-Dosis zur vollständigen Inaktivierung. Lediglich bei photometrischer Auswertung zeigte sich bei einer mit 100 ng/ml gespikten Probe nach Verlängerung der Einwirkzeit von 30 Minuten auf 120 Minuten eine Verringerung der Penicillinase-Konzentration.

Tabelle 23: Einfluss der Inkubationszeit mit Penicillinase auf die vollständige Inaktivierung von Cloxacillin nach visueller und photometrischer Auswertung

Cloxacillin (ng/ml)	30						60						120														
	IU/ml			µl Konzentrat/ml			IU/ml			µl Konzentrat/ml			IU/ml			µl Konzentrat/ml											
	Visuell	Photo- metrisch	200.000 - 400.000	5,0 - 10,0	2,9 - 5,0	28.571 - 50.000	Visuell	Photo- metrisch	200.000 - 50.000	2,86 - 10,0	2,9 - 5,0	28.571 - 50.000	Visuell	Photo- metrisch	200.000 - 400.000	40 - 60	20 - 40	200.000 - 400.000	40 - 60	20 - 40	28.571 - 50.000	Visuell	Photo- metrisch	200.000 - 400.000	20 - 40	20 - 40	200.000 - 400.000
30	50.000 - 100.000	28.571 - 50.000	200.000 - 400.000	5,0 - 10,0	2,9 - 5,0	28.571 - 50.000	28.571 - 100.000	28.571 - 50.000	2,86 - 10,0	2,9 - 5,0	28.571 - 50.000	28.571 - 50.000	28.571 - 50.000	200.000 - 400.000	40 - 60	20 - 40	200.000 - 400.000	40 - 60	20 - 40	28.571 - 50.000	28.571 - 50.000	28.571 - 50.000	28.571 - 50.000	200.000 - 400.000	20 - 40	20 - 40	200.000 - 400.000
100	400.000	200.000	200.000	40	20 - 40	200.000	200.000	200.000	20	20	200.000	200.000	200.000	200.000	40	40	200.000	40	40	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	20 - 40	20 - 40	200.000
1000	600.000	600.000	600.000	60	60	400.000	400.000	400.000	40	40	400.000	400.000	400.000	400.000	60	60	400.000	60	60	400.000	400.000	400.000	400.000	400.000	20 - 40	20 - 40	400.000

Tabelle 24: Einfluss der Inkubationszeit mit Penicillinase auf die vollständige Inaktivierung von **Nafcillin** nach visueller und photometrischer Auswertung

Nafcillin (ng/ml)	30				60				120			
	IU/ml		µl Konzentrat/ml		IU/ml		µl Konzentrat/ml		IU/ml		µl Konzentrat/ml	
	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch
30	4.000	4.000	0,4 – 0,4	0,4	2.000 – 4.000	2.000 – 2.857	0,2 – 0,4	0,2 – 0,3	1.000 – 2.000	1.000 – 1.333	0,1 – 0,2	0,1 – 0,13
100	6.667 – 10.000	6.667 – 10.000	0,7 – 1,0	0,7 – 1,0	4.000 – 10.000	4.000 – 10.000	0,4 – 1,0	0,4	2.857 – 4.000	2.000 – 2.857	0,29 – 0,4	0,2 – 0,29
1000	20.000	20.000	2	2	10.000 – 20.000	10.000 – 20.000	1,0 – 2,0	1,0 – 2,0	4.000 – 6.667	4.000 – 6.667	0,4 – 0,67	0,4 – 0,67

Tabelle 25: Einfluss der Inkubationszeit mit Penicillinase auf die vollständige Inaktivierung von **Cefoperazon** nach visueller und photometrischer Auswertung

Cefoperazon (ng/ml)	30						60						120					
	IU/ml		µl Konzentrat/ml		IU/ml		µl Konzentrat/ml		IU/ml		µl Konzentrat/ml		IU/ml		µl Konzentrat/ml			
	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch		
50	2.000 -4.000	2.000 -4.000	0,2 - 0,4	0,2 - 0,4	2.000 -4.000	2.000 -4.000	0,2 - 0,4	0,2 - 0,4	2.000 -4.000	2.000 -4.000	0,2 - 0,4	0,2 - 0,4	2.000 -4.000	1.000 -1.000	0,2 - 0,4	0,1 -0,1		
100	4.000 -6.667	2.000 -6.667	0,4 -0,67	0,2 - 0,7	4.000 -2.857	2.000 -2.857	0,4 -0,29	0,2 -0,29	2.000 -2.857	2.000 -2.857	0,4 -0,29	0,2 -0,29	2.000 -2.857	1.000 -1.333	0,2 -0,29	0,1 -0,13		
1000	20.000 -40.000	20.000 -40.000	2,0 - 4,0	2,0	20.000 -20.000	20.000 -20.000	2,0	2,0	20.000 -20.000	20.000 -20.000	2,0	2,0	10.000 -10.000	6.667 -10.000	1,0 -1,0	0,67 -1,0		

Tabelle 26: Einfluss der Inkubationszeit mit Penicillinase auf die vollständige Inaktivierung von **Ceftiofur** nach visueller und photometrischer Auswertung

Ceftiofur (ng/ml)	30						60						120					
	IU/ml			µl Konzentrat/ml			IU/ml			µl Konzentrat/ml			IU/ml			µl Konzentrat/ml		
	Visuell	Photo- metrisch	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Photo- metrisch	Visuell	Photo- metrisch	Photo- metrisch
100	10.000	10.000	10,0	10,0	10,0	10,0	10.000	10.000	10.000	10,0	10,0	10,0	10.000	10.000	20.000	10,0	10,0	4,0
	- 20.000	- 20.000	- 20,0	- 20,0	- 20,0	- 20,0	- 20.000	- 20.000	- 20.000	- 20,0	- 20,0	- 20,0	- 20.000	- 20.000	- 50.000	- 20,0	- 20,0	- 10,0
	600.000	400.000	60,0	40,0	40,0	60,0	400.000	400.000	400.000	60,0	40,0	40,0	600.000	400.000	400.000	60,0	40,0	40,0
500	- 2.000.000	2.000.000	- 100,0	- 100,0	- 100,0	- 100,0	- 2.000.000	- 2.000.000	- 2.000.000	- 100,0	- 100,0	- 100,0	- 2.000.000	- 2.000.000	- 2.000.000	- 100,0	- 100,0	- 100,0
1000	1.000.000	1.000.000	100,0	100,0	100,0	100,0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	100,0	100,0	100,0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	100,0	100,0	60,0
	600.000	600.000	6,0	6,0	6,0	6,0	600.000	600.000	600.000	60,0	60,0	60,0	600.000	600.000	600.000	60,0	60,0	60,0
	1.000.000	1.000.000	100,0	100,0	100,0	100,0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	100,0	100,0	100,0	1.000.000	1.000.000	1.000.000	100,0	100,0	100,0

4.3 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die vollständige Inaktivierung verschiedener β -Laktam-Antibiotika

Eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur von 22 °C auf 4 °C oder eine Erhöhung auf 40 °C bzw. 60 °C hatte nur geringen Einfluss auf die Inaktivierung der Antibiotika (Tabellen 27 - 36). Es zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 40 °C die Penicillinase-Dosis zur vollständigen Inaktivierung etwas geringer war als bei Werten um 22 °C. Eine Inkubationstemperatur von 4 °C erforderte eine leichte Penicillinase-Dosis-Erhöhung zur vollständigen Inaktivierung. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 60 °C bedingte ebenfalls eine Zunahme der Penicillinase-Konzentration zur vollständigen Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika, die im Vergleich etwas höher lag als bei 4 °C.

Tabelle 27: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Penicillin G** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach visueller Auswertung

Penicillin G (ng/ml)	4 °C		22 °C		40 °C		60 °C	
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
10	667 – 1.000	0,07 - 0,1	444 - 571	0,04 - 0,06	286 - 400	0,03 - 0,04	1.000 – 2.000	0,1 - 0,2
100	1.667 – 2.000	0,17 – 0,2	1.000 – 1.176	0,1 - 0,12	571 – 1.000	0,06 - 0,1	2.000 – 4.000	0,2 - 0,4
1000	2.500 – 4.000	0,25 - 0,4	1.538 – 2.000	0,15 - 0,2	1.000 – 1.176	0,1 - 0,12	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 28: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Penicillin G** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **photo-metrischer** Auswertung

Penicillin G (ng/ml)	4 °C			22 °C			40 °C			60 °C		
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
10	571 – 1.000	0,06 - 0,1	444 - 571	0,04 - 0,06	286 - 333	0,03	1.000	0,1	2.000 – 4.000	0,2 - 0,4	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4
100	1.667 – 2.000	0,17 - 0,2	1.000 – 1.176	0,1 - 0,12	571 - 667	0,06 - 0,07	2.000 – 4.000	0,2 - 0,4	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4
1000	2.500 – 4.000	0,25 - 0,4	1.538 – 2.000	0,15 - 0,2	1.000 – 1.176	0,1 - 0,12	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4	2.857 – 4.000	0,29 - 0,4

Tabelle 29: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Cloxacillin** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **visueller** Auswertung

Cloxacillin (ng/ml)	4 °C			22 °C			40 °C			60 °C		
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
30	28.571 – 100.000	2,86 – 10,0	28.571 – 50.000	2,86 – 5,0	28.571 – 40.000	2,86 – 4,0	40.000 – 100.000	4,0 – 10,0	40.000 – 100.000	40.000 – 600.000	40,0 – 60,0	100 – 140
100	400.000	40,0	200.000 – 400.000	20,0 – 40,0	200.000	20,0	400.000 – 1.000.000	40,0 – 60,0	400.000 – 600.000	1.000.000 – 1.400.000	100 – 140	
1000	1.000.000	100	– 1.000.000	60,0 – 100	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0	– 1.400.000	100 – 140	– 1.400.000			

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 30: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Cloxacillin** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **photo-metrischer** Auswertung

Cloxacillin (ng/ml)	4 °C			22 °C			40 °C			60 °C		
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
30	28.571	2,86 – 5,0	20.000	2,0 – 4,0	10.000	1,0 – 2,0	33.333	3,33 – 10,0	– 100.000	– 100.000	– 100.000	– 100.000
	– 50.000		– 40.000		– 20.000		– 200.000		– 200.000			
100	400.000	40,0	100.000	10,0 – 20,0	100.000	10,0 – 20,0	400.000	40,0	400.000	400.000	1.000.000	100 – 140
	– 200.000		– 200.000		– 200.000		– 200.000		– 600.000		– 1.400.000	
1000	1.000.000	100	600.000	60,0	600.000	60,0	1.000.000	100 – 140	1.000.000	1.000.000	1.000.000	100 – 140
	– 200.000		– 200.000		– 200.000		– 200.000		– 600.000		– 1.400.000	

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 31: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Nafcillin** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **visueller** Auswertung

Nafcillin (ng/ml)	4 °C		22 °C		40 °C		60 °C	
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
30	5.000 – 10.000	0,5 – 1,0	5.000 – 6.667	0,5 – 0,67	2.857 – 4.000	0,29 – 0,4	10.000 – 20.000	1,0 – 2,0
100	13.333 – 20.000	1,33 – 2,0	10.000 – 20.000	1,0 – 2,0	6.667	9,67	20.000 – 40.000	2,0 – 4,0
1000	33.333	3,33	20.000	2,0	13.333	1,33	50.000	5,0

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 32: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Nafcillin** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **photo-metrischer** Auswertung

Nafcillin (ng/ml)	4 °C		22 °C		40 °C		60 °C	
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
30	5.000 – 6.667	0,5 – 0,67	4.000 – 5.000	0,4 – 0,5	2.500 – 4.000	0,25 – 0,4	10.000 – 20.000	1,0 – 2,0
100	13.333 – 20.000	1,33 – 2,0	10.000	1,0	5.000 – 6.667	0,5 – 0,67	20.000 – 40.000	2,0 – 4,0
1000	25.000 – 33.333	2,5 – 3,33	20.000	2,0	13.333	1,33	50.000	5,0

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 33: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Cefoperazon** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach visueller Auswertung

Cefoperazon (ng/ml)	4 °C		22 °C		40 °C		60 °C	
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
50	2.000 – 4.000	0,2 – 0,4	2.000	0,2	1.000 – 2.000	0,1 – 0,2	2.000 – 2.857	0,2 – 0,29
100	6.667 – 10.000	0,67 – 1,0	4.000 – 6.667	0,4 – 0,67	2.857	0,29	6.667 – 10.000	0,67 – 1,0
1000	50.000 – 100.000	5,0 – 10,0	28.571	2,86	13.333	1,33	28.571 – 33.333	2,86 – 3,33

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 34: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Cefoperazon** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **photometrischer** Auswertung

Cefoperazon (ng/ml)	4 °C			22 °C			40 °C			60 °C		
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	IU/ml	µl/ml	
50	1.333 – 4.000	0,13 – 0,4	1.000 – 2.000	0,1 – 0,2	667 – 1.000	0,067 – 0,1	2.000 – 2.857	0,2 – 0,29				
100	5.000 – 10.000	0,5 – 1,0	4.000 – 6.667	0,4 – 0,67	2.000 – 2.857	0,2 – 0,29	6.667	0,67				
1000	50.000 – 100.000	5,0 – 10,0	28.571	2,86	13.333	1,33	28.571 – 33.333	2,86 – 3,33				

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Tabelle 35: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Ceftiofur** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **visueller** Auswertung

Ceftiofur (ng/ml)	4 °C		22 °C		40 °C		60 °C	
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
100	Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur							
500	200.000 – 400.000	20,0 – 40,0	200.000 – 400.000	20,0 – 40,0	200.000 – 400.000	20,0 – 40,0	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0
1000	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0	600.000 – 800.000	60,0 – 80,0

Konzentration im BRT nicht nachweisbar

Tabelle 36: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die zur vollständigen Inaktivierung von **Ceftiofur** erforderliche Penicillinase-Konzentration nach **photo-metrischer** Auswertung

Ceftiofur (ng/ml)	4 °C		22 °C		40 °C		60 °C	
	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml	IU/ml	µl/ml
100								
500	100.000 – 200.000	10,0 – 20,0	100.000 – 200.000	10,0 – 20,0	200.000 – 400.000	20,0 – 40,0	200.000 – 400.000	20,0 – 40,0
1000	200.000 – 600.000	20,0 – 60,0	400.000	40,0	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0	400.000 – 600.000	40,0 – 60,0

Minimal erforderlicher Zusatz des Penicillinase-Konzentrates (IU/ml und µl Konzentrat/ml) zur vollständigen Inaktivierung bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur

Konzentration im BRT nicht nachweisbar

5 Diskussion

β -Laktam-Antibiotika gehören in der Mastitisprophylaxe und –therapie nach wie vor zu den am häufigsten eingesetzten antimikrobiell wirksamen Stoffen (MEIER, 2008). Dementsprechend häufig werden sie als Verursacher hemmstoffpositiver Befunde bei der Lebensmittelüberwachung von Milch- und Milchprodukten identifiziert. (MILCHPRÜFRING BAYERN, 2002; KRESS et al., 2007). Die gemäß § 64 LFGB eingesetzten Tests sind zwar gegenüber den β -Laktam-Antibiotika empfindlich, lassen aber keinen genauen Rückschluss auf Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände zu. In den letzten Jahren sind eine Reihe mikrobiologischer und immunochemischer Verfahren als kommerzielle Testsysteme auf den Markt gekommen (LITZ, 1995; KROLL et al., 1999; KROLL, 2000). Keines dieser Testsysteme ist jedoch in der Lage, alle Antibiotika gleichzeitig und ausreichend empfindlich (auf MRL-Niveau) zu erfassen (SUHREN, 2002). Zur Sicherstellung der technologischen Qualität von Milch und ihrer Sicherheit für den Verbraucher wird die Anwendung eines „integrierten Nachweis- und Differenzierungssystems“ empfohlen, das auf der Ausnutzung verschiedener Methoden bzw. Methodenkombinationen (mikrobiologische Tests, Rezeptor-Bindungstests, Enzymimmuntests), sowie dem Einsatz von Zusatzreagenzien, z. B. Penicillinase basiert (HEESCHEN und SUHREN, 1996; SUHREN, 2002; HOLTKÖTTER et al., 2002; KERP et al., 2004).

In dieser Arbeit sollten die Eigenschaften der Penicillinase bezüglich Penicillinasekonzentration sowie Inkubationszeit und –temperatur zur Inaktivierung wichtiger β -Laktam-Antibiotika geprüft werden, zum Nachweis diente der in der Routineuntersuchung von Milch häufig verwendete Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT).

Obwohl die verwendete Penicillinase seit vielen Jahren in der Hemmstoffdiagnostik von Milch eingesetzt wird, fehlten bisher systematische Untersuchungen, inwieweit unter Praxisbedingungen eine Inaktivierung der relevanten Wirkstoffe überhaupt möglich ist.

5.1 Erfassbarkeit von β -Laktam-Antibiotika im Brillantschwarz-Reduktionstest

Die getesteten β -Laktam-Antibiotika konnten mit Ausnahme von Cefalexin und Cefquinom alle im Bereich des MRL-Wertes im Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) erfasst werden. Cefalexin konnte im Bereich des MRL von 100 ng/ml nicht sicher nachgewiesen werden, Cefquinom zeigte keine deutliche Farbabweichung von der Negativkontrolle im Bereich von 100 ng/ml und 500 ng/ml (MRL = 20 μ l/kg). Die Empfindlichkeit des Testsystems für diese beiden Antibiotika liegt auch nach Herstellerangaben oberhalb des MRL-Wertes (AIM, Produktinformation, 2008). Um eine Quantifizierung der Penicillinase bezüglich der vollständigen Inaktivierung dieser beiden Antibiotika zu ermöglichen, wurden daher höhere Antibiotika-Konzentrationen verwendet.

5.2 Empfindlichkeit der verschiedenen β -Laktam-Antibiotika gegenüber der verwendeten Penicillinase

Eine vollständige Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika war mit Ausnahme von Cefalexin und Cefquinom für alle getesteten Wirkstoffe möglich. Eine Klassifizierung der β -Laktam-Antibiotika aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber der getesteten Penicillinase konnte jedoch nur bedingt erfolgen. Penicillin G, Ampicillin und Amoxicillin erwiesen sich als sehr Penicillinase-instabil und werden mit annähernd gleich niedrigen Penicillinase-Dosen vollständig inaktiviert.

Oxacillin wird zu den Penicillinase-festen Penicillinen gerechnet (BAUM, 2004). Durch die in dieser Arbeit verwendete Penicillinase war eine Inaktivierung von Oxacillin jedoch problemlos möglich.

Das oral applizierbare Cefalexin zählt zu den Vertretern der ersten Generation der Cephalosporine ohne erhöhte β -Laktamase-Stabilität (RÜTER et al., 2008). Mit der verwendeten Penicillinase war jedoch keine Inaktivierung des Antibiotikums möglich.

Ebenfalls nicht inaktivierbar durch die eingesetzte Penicillinase war Cefquinom. Die extreme Penicillinase-Stabilität von Cefquinom erklärt sich durch die Modifikation an den Seitenketten des Cephem-Kerns, an Position 7 verfügt Cefquinom über eine Aminothiazol-Methoxyimino-Acetamidgruppe (Intervet, Produktinformation).

5.3 Abweichung zwischen visueller und photometrischer Auswertung

Ein signifikanter Unterschied zwischen visueller und photometrischer Auswertung konnte erwartungsgemäß nicht festgestellt werden. Die photometrische Auswertung ergab geringfügig niedrigere Konzentrationen bezüglich der vollständigen Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika. Dies beruht auf der Tatsache, dass bei der photometrischen Auswertung eine Abweichung von über 60% von der Negativkontrolle als positiv, bei der visuellen Auswertung jede Abweichung von der Negativkontrolle als positiv gewertet wurde.

5.4 Inkubationszeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion hängt neben Temperatur und pH-Wert auch von der Enzymkonzentration, der Substratkonzentration und eventuell vorhandenen Inhibitoren ab. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Inkubationszeit bei gleich bleibendem pH-Wert, Temperatur und gleicher Substratkonzentration untersucht. Es zeigte sich bei längerer Einwirkzeit der Penicillinase, mit Ausnahme von Ceftiofur, dass eine geringere Penicillinase-Dosis zur vollständigen Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika nötig war. Die Penicillinasekonzentration verringerte sich um ein Drittel, teilweise sogar um die Hälfte nach Verlängerung der Inkubationszeit von 30 auf 60 Minuten. Eine Veränderung des Zeitintervalls von 60 auf 120 Minuten zeigte ebenfalls eine Verminderung der zur vollständigen Inaktivierung benötigten Penicillinase-Dosis um ein Drittel, teilweise sogar um die Hälfte. Die Verringerung der Penicillinasekonzentration scheint dabei eher asymptotisch als linear zu verlaufen.

Eine Ausnahme stellte Ceftiofur dar, bei diesem β -Laktam-Antibiotikum zeigte sich kein oder nur ein geringer Einfluss der Inkubationsdauer auf die notwendige Penicillinase-Dosis zur vollständigen Inaktivierung.

5.5 Inkubationstemperatur

Bei den meisten chemischen Reaktionen nimmt die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion mit steigender Temperatur zu. Dies gilt nur für den Temperaturbereich, in dem das Enzym als Protein stabil ist und seine volle Aktivität besitzt. Nimmt die Temperatur über einen bestimmten Punkt hinaus zu, kommt es zur Denaturierung und Inaktivierung der Enzyme (LEHNINGER, 1983). Die optimale Inkubationstemperatur der Penicillinase lag bei den in der vorliegenden Arbeit getesteten Bereichen bei 40 °C. Schon 1946 führten Henry und Housewright Versuche zur Inkubationstemperatur der Penicillinase durch und kamen zu einem Temperaturoptimum von 36 °C (HENRY UND HOUSEWRIGHT, 1946). In der Literatur beschriebene Temperaturoptima von 40 °C bis 45 °C bei ausgewählten Penicillinasen (CHIRICA et al., 1998) konnten durch die durchgeführten Versuche bestätigt werden. Bei 60 °C ist im Vergleich die höchste Penicillinasekonzentration zur Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika nötig. Das beruht vermutlich auf der Abweichung vom Temperaturoptimum des Enzyms, möglicherweise setzen hier bereits auch Denaturierungseffekte ein.

5.6 Einsatz der Penicillinase im integrierten Nachweisverfahren

β -Laktamasen (Penicillinasen) werden schon seit langem zur diagnostischen Inaktivierung von Penicillinen beim mikrobiologischen und enzymimmunochemischen Nachweis verwendet (MOATS, 1999; GRUBELNIK et al., 2001; HOLTKÖTTER et al., 2002). Der Einsatz der verwendeten Penicillinase im integrierten Nachweisverfahren erlaubt einen Rückschluss bezüglich des vorhandenen Hemmstoffes. In der Praxis übliche Zusätze von 20 μ l/ml Probe führen zur vollständigen Inaktivierung der folgenden β -Laktam-Antibiotika im Bereich des jeweiligen MRL-Wertes: Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin, Cefoperazon, Ceftiofur und Cefalonium. Zur sicheren Inaktivierung von Dicloxacillin, Cefazolin, Cefapirin und Cefacetril wird eine doppelt so hohe Dosis Penicillinase benötigt, ein Zusatz von 40 μ l/ml führt bei diesen Antibiotika zur vollständigen Inaktivierung. Cefalexin und

Cefquinom sind auch durch einen 10-fach über der üblichen Penicillinase-Dosis liegenden Zusatz nicht zu inaktivieren. Inkubationszeit und Inkubationstemperatur üben nur einen geringen Einfluss auf die vollständige Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika aus, so dass in der Praxis übliche Inkubationszeiten von 30 Minuten bei 22 °C ausreichend sind.

Während somit der Einsatz von Penicillinase zur Abgrenzung zwischen β -Laktam-Antibiotika und anderen Antibiotika als brauchbar angesehen werden kann, muss bei der Diagnose „anderer Antibiotika“ berücksichtigt werden, dass Cefalexin oder Cefquinom als Penase stabile Wirkstoffe zu einer falschen Eingruppierung führen. Besonders Cefquinom wird bei Milchkühen in immer größerem Umfang eingesetzt, so dass hier mit Problemen gerechnet werden muss.

Orientierende Untersuchungen unter Verwendung einer anderen Penicillinase (Sigma Chemie GmbH, P-0389, Lot Nr. 010K40542) zeigten abweichende Ergebnisse, z.B. war zur Inaktivierung von Nafcillin im Vergleich zu Ceftiofur oder Cefoperazon eine deutlich höhere Penicillinase-Dosis notwendig. Beim Einsatz einer anderen als der in dieser Arbeit verwendeten Penicillinase sind gegebenenfalls weiterführende Studien nötig. Grundsätzlich zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch, dass Penicillinase in der Routineanalytik von β -Laktam-Antibiotika ein wertvolles Hilfsmittel darstellt, das zu einer einfachen und kostengünstigen (vorläufigen) Identifizierung von hemmstoffpositiven Milchproben unbedingt eingesetzt werden sollte.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Eigenschaften der Penicillinase bezüglich Penicillinasekonzentration, Inkubationszeit und –temperatur zur Inaktivierung einiger ausgewählter β -Laktam-Antibiotika.

Um die Penicillinasekonzentration zur vollständigen Inaktivierung der verwendeten β -Laktam-Antibiotika zu erfassen, wurde antibiotikahaltige Milch mit Penicillinase versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis noch vorhandener β -Laktam-Antibiotika-Rückstände erfolgte mittels eines mikrobiologischen Testverfahrens (BRT). Mit der verwendeten Penicillinase wurden mit Ausnahme von Cefalexin und Cefquinom alle eingesetzten Antibiotika inaktiviert.

Als Zusatzreagenz für den Einsatz in den verschiedenen Verfahren des integrierten Nachweissystems eignet sich die Penicillinase zur Detektion von β -Laktam-Antibiotika, mit Ausnahme von Cefalexin und Cefquinom. Eine Identifizierung der einzelnen Substanzen ist jedoch nicht möglich. Um eine vollständige Inaktivierung der mit dieser Penicillinase hydrolysierbaren Antibiotika im Bereich ihres jeweiligen MRL-Wertes zu erreichen, sollten die in der Praxis üblichen Penicillinasekonzentrationen von 20 $\mu\text{l/ml}$ (200.000 IU/ml) auf 40 $\mu\text{l/ml}$ (400.000 IU/ml) angehoben werden.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit sowie eine Veränderung der Inkubationstemperatur haben nur einen geringen Einfluss auf die vollständige Inaktivierung der β -Laktam-Antibiotika, so dass bei der Verwendung der Penicillinase im integrierten Nachweissystem eine Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur ausreichend ist.

7 Summary

This paper deals with the characteristics of penicillinase with regard to penicillinase concentration, incubation time and incubation temperature for inactivation of some selected β -lactam antibiotics.

To determine the penicillinase concentration required to thoroughly inactivate the β -lactam antibiotics used, penicillinase was added to antibiotic-positive milk and incubated at room temperature for 30 minutes. Remaining β -lactam antibiotic residues were identified using a microbiological test procedure (BRT). With the exception of cefalexin and cefquinom, all antibiotics applied were inactivated by penicillinase used.

Penicillinase is suitable for use as an additional reagent in the various test procedures of an integrated identification system for the detection of β -lactam antibiotics with the exception of cefalexin and cefquinom. However, the individual substances cannot be identified. To thoroughly inactivate the antibiotics that are hydrolysable with this penicillinase within the range of their respective MRL value, the penicillinase concentrations normally used in practice should be increased from 20 $\mu\text{l/ml}$ (200.000 IU/ml) to 40 $\mu\text{l/ml}$ (400.000 IU/ml).

An extended incubation time as well as a change in incubation temperature only slightly influences the thorough inactivation of β -lactam antibiotics. Therefore, an incubation time of 30 minutes at room temperature suffices when using in an integrated identification system.

8 Literaturverzeichnis

ABRAHAM, E.P. und E. CHAIN (1940):

An enzyme from bacteria able to destroy Penicillin

Nature, **146**: 837

ADAM, D. und W. CHRIST (1987):

Antibiotika und Chemotherapeutika.

In: FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage, 580-625

B. I. Wissenschaftsverlag, Mannheim u.a.

AIM(Analytik in Milch GmbH, 2008):

Brillantschwarz-Reduktionstest, Basisinformation und Hintergründe

Produktinformation

AMBLER, R. P. (1980):

The structure of b-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond.

Biol. Sci. **289**: 321–331.

ANDREW, S. M., R. A. FROBISH, M. J. PAAPE und L. J. MATURIN (1997):

Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes

J. Dairy Sci. **80**, 3050-3057

BAUM, U. (2004):

Arzneimittellehre

Weisse Reihe Band **3**, 7. Auflage, Verlag Urban & Fischer

BEYER, F. (1986):

Hemmstoffe in Milch aus technologischer Sicht.

Dtsch. Molkerei-Ztg. **107**, 898-899

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

Chromatographic analysis of antibiotic materials in food

J. Chromatogr. **624**, 153-170

BUSH, K. (2001):

New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy

Clin. Infect Dis. **32**, 1085-9

BUSH K. und R.B. SYKES (1983):

β -Lactamase inhibitors in perspective

J. Antimicrob. Chemother. **11**, 97-107

BUSH, K., G.A. JACOBY und A.A. MEDEIROS (1995):

A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure

Antimicrob. Agents Chemother. **39**: 1211-1233

CARLSSON, A. und L. BJÖRCK (1987):

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

Milchwiss. **42**, 282-285

CHIRICA, L.-C., T. GÜRAY, G. C. GÜRAKAN und T. F. BOZOGLU (1998):

Characterization of extracellular β -lactamases from Penicillin G-resistant cells of *Streptococcus thermophilus*

J. Food Prot. **61**, number 7, 896-898

DEWDNEY, J. M., L. MAES, J. P. RAYNAUD, F. BLANC, J. P. SCHEID, T. JACKSON,

S. LENS und C. VERSCHUEREN (1991):

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

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

EKINS, R. P. (1985):

Current concepts and future developments

In: COLLINS, W. P.: Alternative Immunoassays, Kap. 13, 219-237

Wiley & Sons, Chichester u.a.

FEUERSTEIN, A. (1987):

Untersuchungen zu Ausscheidungsdauer und Wirksamkeit nach dem Trockenstellen von Kühen mit einem Oxacillinpräparat.

Diss med. vet. München

GARCIA, J. J., M. BLANCA, F. MORENO, J. M. VEGA, C. MAYORGA, J. FERNANDEZ,

C. JUAREZ, A. ROMANO und E. DERAMON (1997):

Determination of IgE antibodies to the benzylpenicilloyl determinant: a comparison of the sensitivity and specificity of three radio allerge sorbent test methods

J. Clin. Lab. Anal. **11**, 251-257

GEDEK, W. (1977):

Erfassung von Cephalosporinen in Rohmilch durch B.-cereus-Beta-Lactamase

Dtsch. Tierärztl. Wschr. **84**, 340-342

GEDEK, W. (1984):

Hemmstoffe in der Milch: Alte und neue Frage

Deutsche Molkereizeitung **50**, 1779-1787

GEISEL, R. und F.-J. SCHMITZ (2000):

Aufbau, Funktion und Verbreitung von Integrons als mobile Überträger von Antibiotikaresistenzgenen

Der Mikrobiologe **10**, 201-207

GRUBELNIK, A., C. PADESTE und L. TIEFENAUER (2001):

Highly sensitive enzyme immunoassays for the detection of β -lactam antibiotics

Food Agric. Immunol. **13**, 161-169

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

HENRY, R. J. und R. D. HOUSEWRIGHT (1946):

Studies on penicillinase

Journal of biological chemistry, 559-571

HILL B.M. und J.M. SMALL (1985)

Antibiotic residue release at the beginning of lactation following dry cow therapy

New Zealand Veterinary Journal, Volume 33, Number 7, 105-107

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

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

In: 43. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 417-421

HORNISH, R. E. und S. F. KOTARSKI (2002):

Cephalosporins in veterinary medicine – ceftiofur use in food animals

Curr. Top. Med. Chem. 2, 717-731

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

Jahresbericht 2002

www.hvl-alsfeld.de, alsfeld@t-online.de

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

Jahresbericht 2003

www.hvl-alsfeld.de, alsfeld@t-online.de

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

Jahresbericht 2004

www.hvl-alsfeld.de, alsfeld@t-online.de

INTERVET (2004):

Cobactan ® 2,5%

Produktinformation

KINAST, S. (2008):

Strategien zur Synthese von Abyssomicin C Derivaten

Diss. rer. nat., Tübingen zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

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

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

In: 45. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen

Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 252-257

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., W. LÖSCHER, J. SIMUNEK, H. TROLLDENIER und F. R. UNGEMACH (1996):

Chemotherapie bakterieller Infektionen

In: FREY, H. -H. und W. LÖSCHER: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für
die Veterinärmedizin, 454-532

Enke Verlag, Stuttgart

KROKER, R. (1999):

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen

In: LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH und R. KROKER

Pharmakotherapie bei Haus- u. Nutztieren, 4. Auflage, Kap. N, 211-225

Paul Parey Verlag, Hamburg, Berlin

KROLL, S. (2000):

Zur Eignung von Schnelltestverfahren zum Rückstandsnachweis von Beta-Lactam-Antibiotika in Milch.

Diss. Vet. Med., München

KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF, E. SCHNEIDER und E. MÄRTLBAUER (1999):

Vergleichsuntersuchung kommerzieller Schnelltests für Betalaktam-Antibiotika in Milch

In: 40. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 330-336

LEHNINGER A.L. (1983):

Biochemie

Verlag Chemie, 147-172

LESSEL, J. (1996):

Penicillin-bindende Proteine: das Target der β -Lactam-Antibiotika

Wirkungsmechanismus von β -Lactamasen und deren Inhibitoren

Pharm. uns. Zeit **25**, 17-27

LITZ, S. (1995):

Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen

Diss. med. vet. München

MÄRTLBAUER, E. (1993):

Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe

Enke Verlag, Stuttgart

MARRE, R., I. SCHERINGER, A. ERB, H.-P. ZEITLER, T. STÜRMER und H. BRENNER (2002):
Prävalenz der E.-coli-Antibiotikaresistenz in der Allgemeinbevölkerung
Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, **45**, Nummer 2, 130-137

MASON, I. S. und M. KIETZMANN (1999):
Cephalosporins-pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology
Vet. Dermatology **10**, 187-192

MEALEY, K.L. (2001)
Penicillins and β -lactamase inhibitor combinations
JAVMA **218**, number 12: 1893-1896

MEDEIROS, AA. (1997):
Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam
antibiotics
Clin. Infect. Dis., **24** (Suppl 1): 19-45

MEIER, B. (2008):
Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Cefalexin,
Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch
Diss med. vet., Giessen

MEYER-BURGMAYER, M. (1980):
Zur Frage unspezifischer Reaktionen bei der Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe
Diss. med. vet., München

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (1992):
Tätigkeitsbericht

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2002):
Tätigkeitsbericht

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2006):
Tätigkeitsbericht

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2007):

Tätigkeitsbericht

MINKIN, W. und P.J. LYNCH (1969):

Allergic reaction to penicillin in milk

Jama **209**, 1089-1090

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

MOATS, W.A. (1999):

Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by β -lactam antibiotics screening tests

J. AOAC Int. **82**, 1071-1077

MORETAIN, J. P. und C. FROGER (1995):

Penzym 100 und Penzym 50 durch AFNOR validiert

Deutsche Milchwirtschaft **24**, 1341-1344

NAVRÁTILOVÁ, P. (2008):

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

Czech J. Food Sci. **26**, 393-401

NEAVES, P. (1999):

Monitoring antibiotics in milk - the changing world of test methods

British Mastitis Conference, Internetausdruck 2004

www.iah.bbsrc.ac.uk/bmc/1999

NEFTEL, K.A. und W.J. PICHLER (2006):

Unverträglichkeit von Betalaktam-Antibiotika: praktische Probleme und ihre Ursache

Schweiz Med Forum **6**, 319-326

PLUMB, D.C. (2002):

Veterinary Drug Handbook.

PharmaVet Publishing, White Bear Lake, Minnesota, 4. Edition

RÜTER, A., O. TRENTZ und M. WAGNER (2008):

Unfallchirurgie

Elsevier GmbH Deutschland, 2. Auflage, S. 285

SCHÄLLIBAUM, M. (1989):

Antibiotikatherapie und Rückstände in der Ablieferungsmilch

Swiss Food **12**, 7-9

SCHNEIDER, C. (2004):

Neue Strukturen und Targets für β -Laktamase-Inhibitoren

Diss. rer. nat., Bonn

SHAIKH, B. und W. A. MOATS (1993):

Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin

J. Chromatogr. **643**, 369-378

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

Antibiotika und Chemotherapeutika

In: FORTH, W. , D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN und K. STARKE

(Herausgeber): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage,

791-828

Urban & Fischer Verlag, München

STRASSER, A. (2003):

Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch –

Herstellung der immunchemischen Komponenten

Diss. med. vet., München

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

Detection of inhibitors in milk by microbial tests. A review

Nahrung **40**, 1-7

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

Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch - Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest

Deutsche Molkereizeitung **14**, 674-681

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

Screening-Verfahren zum Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch

In: 39. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht, 584-589

SUHREN, G. (2002):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch - rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. **54**, 35-73

TEUFEL, P. (1998):

Jahresbericht

BAFM, Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Kiel

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

THEURETZBACHER U. (2004)

Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren, neue Erkenntnisse

Chemother J **13**, 206-217

WICHER, K., R. E. REISMAN und C. E. ARBESMAN (1969):

Allergic reaction to penicillin present in milk

J. Am. Med. Assoc. **208**, 143-145

WIEGAND (2003):

Molekulare und biochemische Grundlagen der beta-Laktamresistenz durch beta-Laktamasen.

Chemother J **6**: 151-167

ZAADHOF, K.-J., E. MÄRTLBAUER, A. VORREITER und L. SCHWEITZER (1997):

Zur Eignung kommerzieller mikrobiologischer Hemmstofftests als Suchverfahren auf das

Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis

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

ZOMER, E. und T. LIEU (1996):

Performance of a broad spectrum anti-microbial drug inhibition assay (AIM 96) in an interlaboratory collaborative study in bulk raw milk

Milchwiss. **51**, 696-698

Zitierte Gesetze, Verordnungen, Richtlinien, amtliche Untersuchungsverfahren

Arzneimittelgesetz (AMG) vom 24. August 1976 in Geltung ab 6. Juni 1986. Neugefasst durch die Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (I 3394).

BGBI I 1976, 2445, 2448

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 1. September 2005. Neugefasst durch die Bekanntmachung vom 26. April 2006 (I 945), zuletzt geändert durch Artikel 12 G. v. 26.02.2008.

BGBI I 2005, 2618, (3007)

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung) vom 09. Juli 1980 in der Fassung der sechsten Verordnung vom 30.10.03, in Kraft ab dem 01. Januar 2004

BGBL I , 2170

Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 06.05.2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates

Amtsblatt der Europäischen Union L 152 vom 16.06.2009, 11–22

Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 125 vom 23.05.1996, 10-32

Richtlinie 96/23/EG des Rates über die Rückstandsüberwachungspläne. Zuletzt geändert durch die Entscheidung 2006/208/EG der Kommission vom 7. März 2006 zur Änderung der Entscheidung 2004/432/EG.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 75 vom 14.3.2006, 20–25

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

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 303 vom 6.11.1997

Verordnung zur Änderung der Verordnung über Nachweispflichten für Arzneimittel, die zur Anwendung bei Tieren bestimmt sind und zur Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken vom 21. August 2001

BGBI I 2001, 2131

9 Abkürzungsverzeichnis

7-ACS = 7-Aminocephalosporansäure

aqua. dest. = Aqua destillata, destilliertes Wasser

AMG = Arzneimittelgesetz

6-APS = 6-Aminopenicillansäure

B. = *Bacillus*

BGBI = Bundesgesetzblatt

BRT = Brillantschwarz-Reduktionstest

BVL = Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

EIA = Enzymimmunoassay

ELISA = Enzyme-linked-immuno-sorbent assay, Enzymimmunoassay 216

Enk = Extinktionswert Negativkontrolle

et al. = et alii, und andere

Epk = Extinktionswert Positivkontrolle

Epr = Extinktionswert Probe

EU = Europäische Union

E(W)G = Europäische (Wirtschafts-)Gemeinschaft

FIA = Fluoreszenzimmunoassay

HVL = Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.

IgE-Antikörper = Antikörper der Immunglobulinklasse E

i.m. = intramuskulär

IU = international units (Internationale Einheiten)

i.v. = intravenös

kg = Kilogramm

K. = *Klebsiella*

L. = *Lactobacillus*

l = Liter

LFGB = Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch, Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch

LU = Levi Units (Enzymaktivität)

mg = Milligramm

µg = Mikrogramm

ml = Milliliter

µl = Mikroliter

min = Minuten

MRL(s) = Maximum Residue Limit(s), Rückstandshöchstmenge(n)

n = Anzahl

Na = Natriumsalz

NaOH = Natronlauge

ng = Nanogramm

PBP = Penicillin-bindende-Proteine

PBS = phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte-Kochsalzlösung, Phosphatpuffer

RIA = Radioimmunoassay

P. = *Proteus*

S. = *Staphylococcus*

s.c. = subcutan

UV = Ultraviolett

var. = Varietas, Varietät

VO = Verordnung

WHO = World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. E. Usleber für die freundliche Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die zahlreichen Anregungen sowie die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an die Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, im Besonderen Frau Dr. E. Schneider für die Betreuung, für wertvolle Anregungen, allzeit gewährte fachliche Hilfestellung und ihr freundliches Entgegenkommen richten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern für Ihre Geduld, Ihren moralischen Beistand und Ihre stetige Unterstützung seit Beginn meines Studiums. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Mann für sein Verständnis während dieser Zeit.

EIDESTATTLICHE 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 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.

T. Fingerhuth

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 3-8359-5512-8



9 178 38 3519 531 27