

SPR-Analytik von Tetracyclinen in Matrices tierischer Herkunft

Vom Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der
Bergischen Universität Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Simone Janine Krause, geb. Burau

aus

Oberhausen

2013

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20131023-092150-6

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20131023-092150-6>]

Abstract

Tetracyclines are the most commonly used class of antibiotics in veterinary medicine due to their broad spectrum activity. The use of four tetracyclines (chlortetracycline, tetracycline, oxytetracycline and doxycycline) is allowed in the European Union for all food-producing species. Maximum residue limits (MRL) in different tissues are mandatorily defined to maintain consumer health protection. A check for compliance with these limits requires precise quantification methods. However, to reduce the number of analyzed samples, distinguishing between positive and negative samples also needs quick and easy to use, but nevertheless reliable screening assays.

Möller et al. described a tetracycline-specific assay using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor based on a bacterial resistance mechanism against tetracycline in gram negative bacteria. The resistance mechanism relies on the expression of an efflux protein. As long as no tetracycline is present, the repressor protein TetR binds to a short DNA sequence called *tetO* and suppresses the biosynthesis of the efflux-protein. When tetracycline enters the bacterial cell, it binds to the repressor protein TetR and initiates a conformational change causing its release from the DNA with subsequent generation of the efflux-protein.

The focus of this thesis is the application of this assay on complex matrices like kidney. A sample preparation method was developed, which is both quick and easy to perform. Each of the four tetracyclines could reliably be detected in kidney of pig, cow, calf and lamb at the half MRL. This assay was successfully applied not only to manually doped samples, but also to samples with incurred residues. The assay imitates a biological system and therefore requires specific physiological conditions. Thus, the sample preparation method could not employ organic solvents for extraction of tetracyclines from the matrix.

Robustness tests included a study on chlortetracycline storage. Storing chlortetracycline solutions at temperatures higher than -20°C led to degradation and can therefore not be recommended. The assay is sensitive to the running buffer used. With two commercially available running buffers assay stability was achieved. The assay was successfully applied on samples from the official surveillance system.

Dank

Die vorgelegte Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2008 bis einschließlich Mai 2012 an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Petz.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Petz für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit weitgehend frei zu bearbeiten. Zudem möchte ich ihm für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Heiko Hayen danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Reineke und seinen Mitarbeitern Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt und Dr. Christian Mandt danke ich für die Möglichkeit Teile der Probenaufarbeitung im Arbeitskreis der Mikrobiologie durchzuführen.

Frau Dr. Götz-Schmidt aus dem Bayerischem Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Erlangen, gilt mein Dank für die Bereitstellung des gewachsenen Probenmaterials und die LC-MS/MS-Daten.

Frau Dr. Müller-Seitz möchte ich für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen zu auftretenden Problemen und den Ergebnisse meiner Arbeit danken.

Herrn Sven Meckelmann danke ich für die Dotierung der Proben für die verdeckte Kontrollanalyse.

Dem gesamten Arbeitskreis der Lebensmittelchemie danke ich für die gute Zusammenarbeit, eine tolle Arbeitsatmosphäre und eine wirklich schöne Zeit auch außerhalb der Arbeitszeit.

Meinen Freunden, insbesondere Frau Dr. Nicole Krüger, Frau Dr. Jessica Schumacher und Frau Sarah Peters danke ich für ihre Unterstützung während dieser Zeit.

Meinen Eltern, Dagmar und Norbert Gickel, möchte ich dafür danken, dass sie mir immer unterstützend zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Tim Krause für seine Geduld und sein Verständnis während der gesamten Zeit in der diese Arbeit entstand. Er hat es auch in schwierigen Zeiten immer geschafft mich zu motivieren und aufzumuntern.

Für Tim

Inhalt

1. Einleitung.....	1
2. Tetracycline.....	2
2.1 Herkunft und Geschichte	2
2.2 Chemie	2
2.3 Wirkung	10
2.4 Anwendung in der Veterinärmedizin.....	12
2.5 Rechtliche Regelungen.....	14
2.6 Kontrolle/ Monitoring	16
2.7 Resistenzen.....	19
2.8 Das Operator-Repressor-System	23
3. Nachweisverfahren für Tetracycline	26
3.1 Screening-Methoden	26
3.2 Chemisch-physikalische Verfahren	30
4. Nachweis mittels Biosensorverfahren.....	32
4.1 Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz	32
4.2 Rückstandsanalyse.....	40
5. Zielsetzung	43
6. Ergebnisse und Diskussion	45
6.1 Verwendeter Assay.....	45
6.2 Probenextraktion mit dem Stomacher.....	49
6.2.1 Nachweis verschiedener Tetracycline.....	56
6.2.2 Nachweis Chlortetracyclin.....	61
6.2.3 Nieren unterschiedlicher Tierarten	67
6.2.4 Verdeckte Kontrollanalyse	71
6.2.5 Analyse von gewachsenen Rückständen in Nieren.....	75
6.3 Weitere Versuche zu Probenaufarbeitungen	84
6.3.1 Enzymatischer Abbau der Matrixproteine durch Protease	84
6.3.2 Aufarbeitung mittels Ultra-Turrax, Ultrazentrifugation und Ultrafiltration	87
6.4 Robustheit	98
6.4.1 Lagerstudie Chlortetracyclinlösungen	99
6.4.2 Robustheit des Assays in Hinblick auf den verwendeten Laufpuffer.....	104
7. Zusammenfassung.....	116

8. Ausblick	119
9. Material und Methoden	121
9.1 Herstellung <i>tet</i> -Operator	121
9.2 SPR-Analyse	122
9.2.1 Präparation der Streptavidin-Sensorchips	124
9.2.2 Belegung des immobilisierten Operators mit TetR	125
9.2.3 Regeneration der Chipoberfläche	125
9.2.4 Lagerung der mit <i>tet</i> O belegten Sensorchips	125
9.2.5 Herstellung von Kalibrierlösungen und Lösungen zum Dotieren	125
9.2.6 Messung der Lagerstabilität von Chlortetracyclinlösungen	126
9.2.7 Herstellung Puffer	127
9.2.8 Injektionssequenz	127
9.3 Probenaufarbeitung	127
9.3.1 Stomacher	127
9.3.2 Enzymatischer Abbau durch Protease	128
9.3.3 Aufarbeitung mit dem Ultra-Turrax	128
10. Abkürzungsverzeichnis	129
11. Literatur	131

1. Einleitung

Zur Therapie und Gesunderhaltung von Tieren und Tierbeständen sind Antibiotika in der Veterinärmedizin unverzichtbar. Neben der therapeutischen Anwendung werden sie auch zur Prophylaxe und Metaphylaxe von ganzen Tiergruppen eingesetzt [1]. Allerdings sind sie kein Ersatz für gute Haltungsbedingungen und Hygienestandards. Ihr Einsatz ist nur dann gerechtfertigt, wenn er tatsächlich erforderlich ist, denn die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen kann zur Entwicklung von resistenten Bakterien führen. Bei ungezieltem Einsatz, niedriger Dosierung und längerer Anwendung steigt dieses Risiko [2]. Bis Ende 2005 durften bestimmte Antibiotika als Leistungsförderer eingesetzt werden. Wegen der Zunahme von resistenten Bakterienstämmen sind sie seit dem 1. Januar 2006 laut EG-Verordnung Nr. 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung verboten [3]. Resistente Bakterien können durch direkten Tierkontakt, aber auch durch Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln übertragen werden. Durch die Aufnahme von Antibiotikarückständen mit der Nahrung kann es auch beim Menschen zur Selektion resistenter Bakterien kommen [1].

Trotz der vorhandenen Resistenzlage sind Tetracycline die am häufigsten eingesetzte Wirkstoffklasse in der Veterinärmedizin. Gründe dafür sind ihr breites Wirkungsspektrum, der niedrige Preis und die gute Verträglichkeit. In der Europäischen Union (EU) sind zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren nur die vier Tetracycline Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin zugelassen [4, 5].

Zum Schutz der Verbraucher vor Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln gibt es verschiedene gesetzliche Regelungen. So müssen nach der Behandlung der Tiere mit Antibiotika gesetzlich vorgeschriebene Wartezeiten eingehalten werden, bevor Tiere geschlachtet oder deren Produkte, wie z.B. Milch, Eier oder Honig, verkauft werden dürfen [6]. Des Weiteren wurden zum Schutz der öffentlichen Gesundheit innerhalb der EU für Tierarzneimittel Rückstandshöchstmengen in essbaren Geweben und Produkten festgelegt. Diese dürfen beim Verkauf des Lebensmittels nicht überschritten werden [7]. Die Überwachung der gesetzlichen Regelungen erfolgt auf nationaler und europäischer Ebene. Zum Nachweis von Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln werden schnelle und empfindliche Analysenverfahren benötigt.

2. Tetracycline

2.1 Herkunft und Geschichte

Das erste Tetracyclin wurde 1948 von Duggar aus Kulturfiltraten von *Streptomyces aureofaciens* gewonnen. Auf Grund seiner gelben Färbung nannte er es Aureomycin (heute: Chlortetracyclin) [8]. Er fand heraus, dass Aureomycin antibiotische Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien besitzt und meldete 1949 das Patent „Aureomycin and Preparation of Same“ an [8, 9].

Kurze Zeit später wurde von dem Unternehmen Chas. Pfizer and Co. eine Substanz mit ähnlichen Eigenschaften aus *Streptomyces rimosus* gewonnen und ebenfalls ein Patent auf dessen Gewinnung und Herstellung angemeldet. Sie nannten ihre Substanz Terramycin, das heute bekannt ist unter dem Namen Oxytetracyclin [10].

Die chemische Struktur von Terramycin wurde nach mehrjähriger Forschung 1953 aufgeklärt und beschrieben [11]. Nur ein Jahr später folgte die Strukturaufklärung von Aureomycin [12]. Im Zuge der Strukturaufklärung wurde auch das Tetracyclin entdeckt. Conover, der bei Chas. Pfizer and Co. arbeitete, gelang es durch katalytische Hydrierung von Aureomycin Tetracyclin herzustellen [13]. Kurze Zeit später konnte das Tetracyclin auch fermentativ gewonnen werden.

Weitere Tetracycline wurden in den folgenden Jahren fermentativ und teilsynthetisch hergestellt. Eine Zusammenfassung über diese Entwicklungen geben Sum et al. und Chopra et al. [14, 15].

2.2 Chemie

Struktur

Das Grundgerüst der Tetracycline besteht aus vier linear kondensierten Sechsringen, die nach IUPAC mit ABCD bezeichnet werden. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome beginnt beim C1 von Ring A und erfolgt weiter gegen den Uhrzeigersinn. Dabei erhält ein tertiäres Brücken-Kohlenstoffatom die Nummer des vorhergehenden Kohlenstoffatoms und einen Buchstaben. Durch die Einführung von funktionellen Gruppen erhält das Tetracyclinmolekül seine biologische Aktivität.

Tetracycline

Das Grundgerüst ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

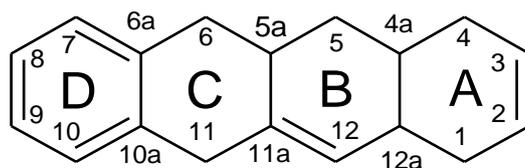


Abbildung 2-1: Grundgerüst Tetracyclin

Tabelle 2-1 zeigt in Verbindung mit Abbildung 2-2 einige Vertreter der Tetracycline.

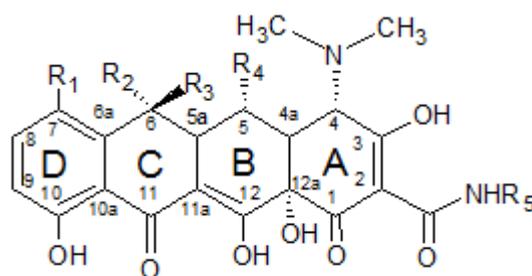


Abbildung 2-2: Grundstruktur der Tetracycline

Tabelle 2-1: Substitutionen verschiedener Tetracycline

Substanz	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tetracyclin	H	CH ₃	OH	H	H
Oxytetracyclin	H	CH ₃	OH	OH	H
Chlortetracyclin	Cl	CH ₃	OH	H	H
Doxycyclin	H	CH ₃	H	OH	H
Sancyclin	H	H	H	H	H
Methacyclin	H	= CH ₂		OH	H
Rolitetracyclin	H	CH ₃	OH	H	-CH ₂ -N
Minocyclin	N(CH ₃) ₂	H	H	H	H

Auf Grund der charakteristisch angeordneten Doppelbindungen enthält das Tetracyclinmolekül die zwei chromophoren Bereiche A und BCD, die durch das sp³-Kohlenstoffatom 12a getrennt werden. Die chromophoren Bereiche absorbieren bei unterschiedlichen Wellenlängen und führen zu charakteristischen UV-Spektren.

Der A-Chromophor absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 262 nm, der BCD-Chromophor bei den Wellenlängen 225, 285, 320 und 360 nm. Bei 275 nm gibt es eine weitere Absorptionsbande, die sich aus mehreren Absorptionen zusammensetzt [16, 17].

Tetracyclinmoleküle sind optisch aktiv, da bei entsprechender Substitution die Kohlenstoffatome 4, 4a, 5, 5a, 6 und 12a asymmetrisch sind. Die Anzahl der Asymmetriezentren variiert. Tetracyclin und Chlortetracyclin besitzen 5, Oxytetracyclin besitzt 6 Asymmetriezentren.

Epimerisierung

Am asymmetrischen Kohlenstoffatom C4 des Tetracyclinmoleküls kann es leicht zu einer Konfigurationsänderung kommen. Diese Isomerisierung wird in der Tetracyclin-Literatur als Epimerisierung bezeichnet und ist die häufigste Umlagerung im Tetracyclin-Molekül. Die gebildeten Isomere werden als „Epimere“ bezeichnet. In

Abbildung 2-3 ist die Epimerisierung von Tetracyclin dargestellt.

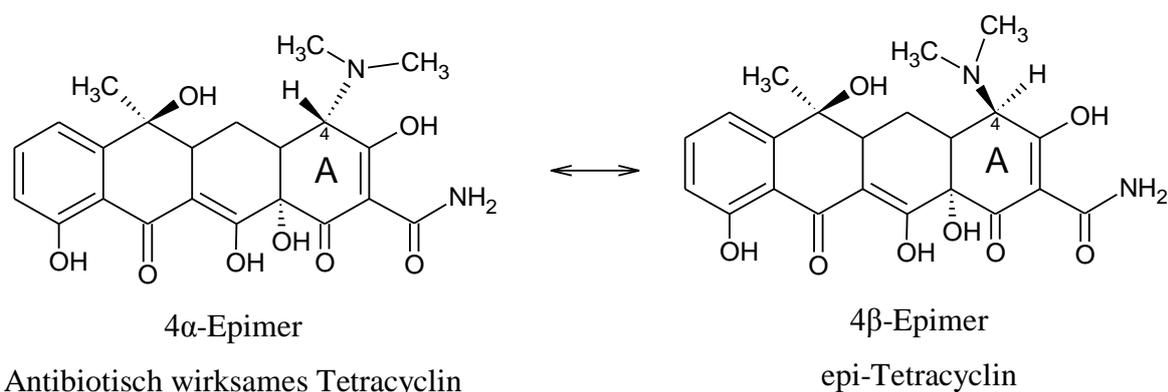


Abbildung 2-3: Epimerisierung von Tetracyclin

Bei der Epimerisierung handelt es sich um eine reversible Reaktion erster Ordnung, die im pH-Bereich zwischen 2 und 6 abläuft [18, 19, 20]. Im Gegensatz zum C4 α -Epimer zeigt das gebildete C4 β -Epimer nur 5% der biologischen Wirksamkeit [18]. In Anwesenheit von

chelatisierenden Metallen kommt es in alkalischen Lösungen zu einer Rückreaktion zu dem biologisch aktiven Isomer [21].

Die Epimerisierung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen die vorhandenen Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2 und C5, die Anwesenheit von Metallkationen, das Lösungsmittel und die Temperatur [20, 21, 22, 23]. Auch die Ionenstärke und der pH-Wert des verwendeten Puffersystems haben einen Einfluss auf die Kinetik der Reaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Temperatur und Ionenstärke und sinkendem pH-Wert [19, 23]. Remmers et al. zeigten, dass der pH-Wert auch einen Einfluss auf die Lage des Gleichgewichtes hat. Der Anteil an epi-Tetracyclin im Gleichgewicht lag bei ihren Untersuchungen je nach pH-Wert zwischen 18 und 55% [19]. In Tabelle 2-2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2-2: Anteil an epi-Tetracyclin im Gleichgewicht [19]

pH-Wert	Anteil epi-Tetracyclin im Gleichgewicht
	[%]
2,4	45
3,2	55
4,0	37
5,0	32
6,0	18

Ketol-Enol-Tautomerie und Protonierung

Tetracycline sind amphoter, d.h. sie können Protonen aufnehmen oder abgeben. Die Konformation der Tetracycline hängt von ihrem Protonierungsgrad ab [24].

Im Tetracyclin-Molekül gibt es drei Bereiche in denen es zur Protonierung oder Deprotonierung kommen kann. Diese Bereiche sind in Abbildung 2-4 dargestellt [25].

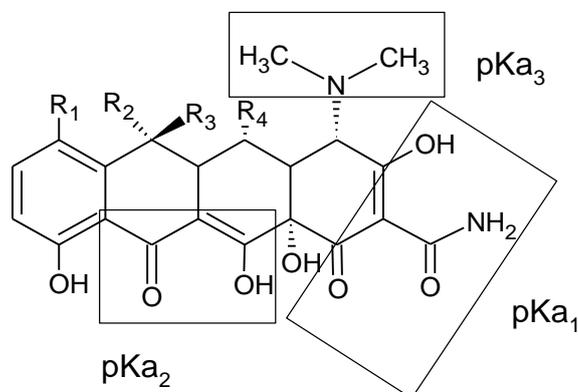


Abbildung 2-4: Bereiche Protonierung und Deprotonierung

Am C3 kann es zur Deprotonierung der Hydroxygruppe kommen. Diese Reaktion wird durch die Keto-Enol-Tautomerie in Ring A, die in Abbildung 2-5 dargestellt ist, begünstigt. Der pK_a liegt hierbei mit ungefähr 3 am niedrigsten.

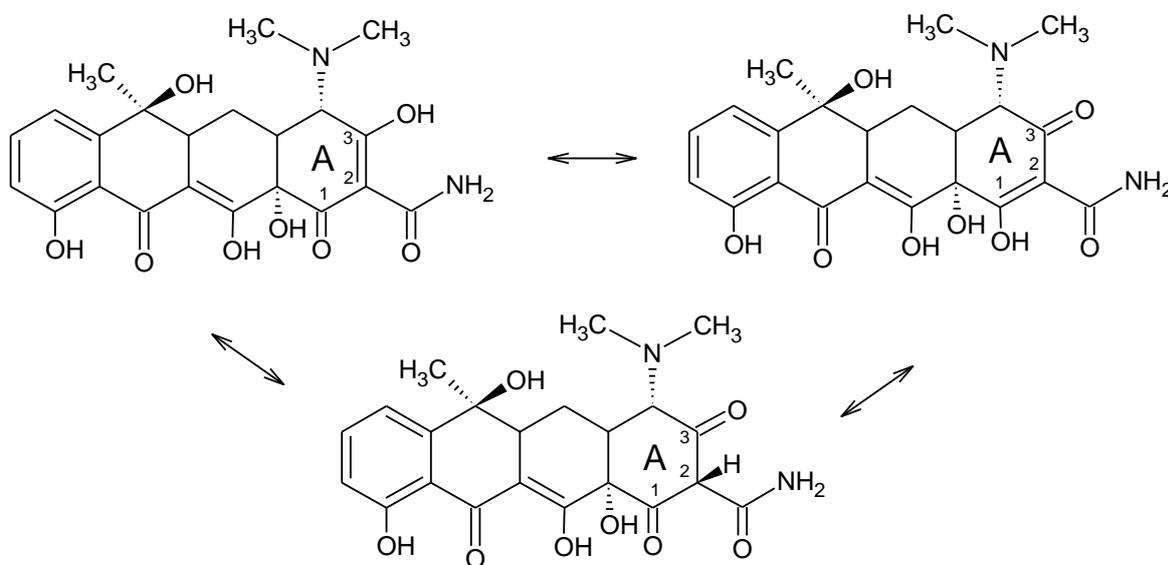


Abbildung 2-5: Keto-Enol-Tautomerie in Ring A

Eine weitere Keto-Enol-Tautomerie weisen die Kohlenstoffatome C11, C11a und C12 in Ring B und C auf. Bei höheren pH-Werten kommt es hier zu einer weiteren Abspaltung eines Protons (pK_{a2}). Der höchste pK_a -Wert (pK_{a3}) ist auf die protonierte Dimethylaminogruppe zurückzuführen.

Duarte et al. führen einen vierten pK_a -Wert bei 12 für die phenolische OH-Gruppe am Kohlenstoffatom C10 an. Diese Deprotonierung kann aber vernachlässigt werden, da sie die Protonierungsgleichgewichte im physiologischen pH-Bereich nicht beeinflusst [26].

Qiang und Adams haben die pK_a -Werte einiger Tetracycline bestimmt. Diese sind in Tabelle 2-3 aufgeführt [25].

Tabelle 2-3: pK_a -Werte einiger Tetracycline nach [25]

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Tetracyclin-HCl	3,3	7,8	9,6
Chlortetracyclin-HCl	3,3	7,6	9,3
Oxytetracyclin-HCl	3,2	7,5	8,9
Doxycyclin-HCl	3,0	8,0	9,2

Die Werte für pK_{a2} und pK_{a3} liegen nah beieinander. Daher liegen Tetracycline in neutraler Lösung meistens als Gemisch mit unterschiedlichem Protonierungsgrad vor.

Isomerisierung

Im basischen Bereich isomerisieren Tetracycline mit einer Hydroxygruppe am C6 zu Iso-Tetracyclinen unter Öffnung von Ring C und Bildung eines Lactons [16].

Während Tetracyclin und Oxytetracyclin erst oberhalb von pH 9 isomerisieren, ist Chlortetracyclin besonders empfindlich und bildet schon bei pH 7,5 in der Wärme Isochlortetracyclin. Tetracycline, die keine Methylgruppe an C6 besitzen, sind im Basischen stabiler [16, 21].

Die Bildung von Isochlortetracyclin ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

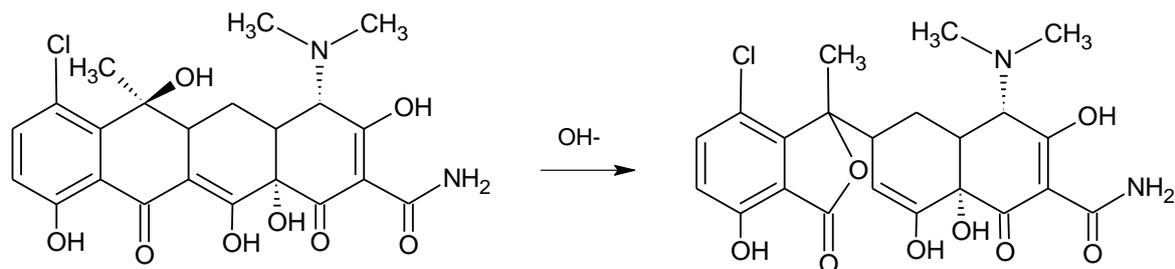


Abbildung 2-6: Bildung von Isochlortetracyclin

Wasserabspaltung/Anhydrotetracycline

Tetracycline mit einer Hydroxygruppe an C6 spalten bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH} \leq 2$) leicht Wasser ab. Dabei bilden Sie unter Aromatisierung von Ring C Anhydrotetracycline. Es handelt sich um eine irreversible Reaktion, die durch Erwärmen begünstigt wird [21].

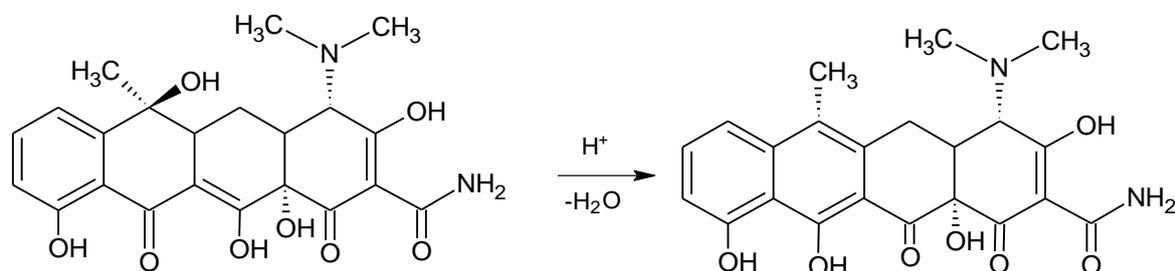


Abbildung 2-7: Bildung von Anhydrotetracyclin

Die Anhydro-Form des Oxytetracyclins ist in wässrigen Lösungen nicht stabil und reagiert weiter zu α - und β -apo-Oxytetracyclin [16].

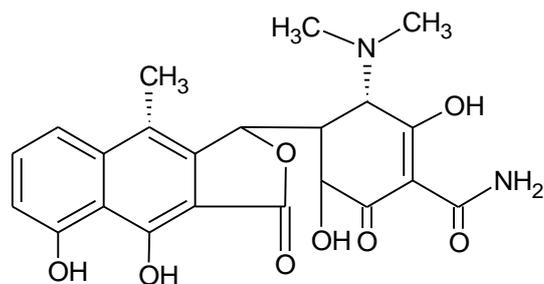


Abbildung 2-8: Struktur apo-Oxytetracyclin

Anhydrotetracycline und 4-epi-Anhydrotetracycline wirken zwar bakterizid, da sie aber in vivo hepato- und phototoxisch sind, finden sie in der Medizin keine Anwendung [24].

Ihre bakterizide Wirkung beruht nicht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese wie bei den anderen Tetracyclinen, sondern auf der Fähigkeit, Zellen zu lysieren [27].

Komplexbildung

Tetracycline können mit Kationen, Anionen, Neutralstoffen und Biopolymeren Komplexe bilden. Tabelle 2-4 gibt eine Übersicht über Stoffe, mit denen Tetracycline Komplexe bilden können [16].

Tabelle 2-4: Mögliche Stoffe, mit denen Tetracycline Komplexe bilden können [16]

Metall-Kationen	Fe ³⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Be ²⁺ , Al ³⁺ , Zr ⁴⁺ , Tc ⁴⁺
Anionen	Phosphat, Citrat, Salicylat, p-Hydroxybenzoat, Saccharin-Anionen
Neutralstoffe	Coffein, Harnstoff, Thioharnstoff, Polyvinylpyrrolidon
Biopolymere	Serumalbumin, Lipoproteine, Globuline, RNA

Mit zwei- oder dreiwertigen Kationen können Tetracycline eine Reihe von Komplexen bilden, die sich in der Konformation, im Protonierungsgrad und im Metall-Ligand-Verhältnis unterscheiden [24].

Die Bildung von Komplexen wird dabei durch die Ladung des Ions und den pH-Wert der Lösung beeinflusst. Liegt der pH-Wert unter 3, bilden Tetracycline keine Komplexe. Bei einem pH-Wert zwischen 3 und 7,5 bildet sich ein Komplex mit dem Phenol-Diketon-System der Ringe BCD aus. Bei höheren pH-Werten wird die 4-Dimethylaminogruppe deprotoniert und mit der 12a-Hydroxygruppe kann ein weiteres Kation gebunden werden. Auf Grund der Hydroxylgruppe an C5 bildet Oxytetracyclin mit Mg²⁺-Ionen oberhalb von pH 7 einen Chelatkomplex zwischen der C5 und der C12a-Hydroxygruppe. Iso-Tetracycline und die 4-epi-Tetracycline bilden nur 1:1-Komplexe [16].

Bei den meisten Metallkomplexen kommt es zu einer Fluoreszenzverstärkung von Tetracyclinen, die analytisch genutzt werden kann [16, 28].

Mit Anionen und Neutralstoffen kommt es zur Bildung schwacher Komplexe, die die Löslichkeit der Tetracycline erhöhen [29].

Tetracycline können reversibel an Albumin, Globuline und Lipoproteine binden. Die hydrophobe Bindung ist abhängig vom pH-Wert und der Temperatur. Sie wird durch unpolare lipophile Gruppen verstärkt, durch polare Gruppen geschwächt und nimmt mit steigender Konzentration an Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen zu [16].

2.3 Wirkung

Wirkungsspektrum

Tetracycline zählen zu den Breitbandantibiotika mit einem weiten Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Bei Pseudomonaden, Proteus und Salmonellen weist das Wirkungsspektrum Lücken auf. Pilze, Hefen, Mykobakterien und Protozoen sind gegen Tetracycline resistent. Die Wirkungsintensität der einzelnen Tetracycline liegt im selben Bereich, wohingegen sie sich in den pharmakokinetischen Eigenschaften, wie Resorption, Gewebediffusion und Elimination unterscheiden [16].

Struktur-Wirkungsbeziehung

Damit Tetracycline antibiotische Wirkung aufweisen, müssen verschiedene strukturelle Voraussetzungen erfüllt sein. In Abbildung 2-9 ist das strukturell einfachste Tetracyclin mit voller biologischer Wirksamkeit, das Sancyclin, dargestellt.

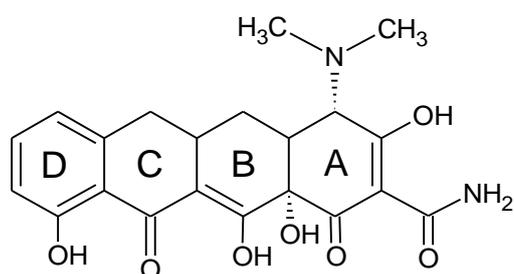


Abbildung 2-9: Struktur Sancyclin

Eine essentielle Voraussetzung für die antibiotische Wirksamkeit der Tetracycline ist die lineare Anordnung der vier Ringe. Derivate mit weniger als vier Ringen zeigen keine antibiotische Wirkung. Auch die Aufspaltung eines Ringes, wie beim Isotetracyclin, oder die Aromatisierung zusätzlicher Ringe, wie beim Anhydrotetracyclin, führen in vivo zu einem Wirkungsverlust.

Auch die beiden Ketol-Enol-Systeme in den Ringen A und BCD sind für die Wirksamkeit erforderlich. Veränderungen in diesem Bereich des Tetracyclinmoleküls, die zu einem verlängerten oder verkürzten Chromophor führen, haben einen teilweisen bzw. vollständigen Wirkungsverlust zur Folge. Beispiele dafür sind die 11a-Halogentetracycline, 12a-Desoxytetracyclin und Pyrazoltetracyclin.

Die Konfiguration der Asymmetriezentren an C5, C5a und C6 kann variiert werden, ohne dass es zum Verlust der biologischen Aktivität kommt, während sie an C4, C4a und C12a essentiell ist. Die α -Konfiguration der 4-Dimethylaminogruppe ist erforderlich für die antibiotische Wirkung. Die β -Epimere zeigen hingegen eine stark verminderte Wirksamkeit. Derivate bei denen die Aminogruppe fehlt, zeigen ebenfalls keine Aktivität mehr [16, 18].

Allgemein kann gesagt werden, dass der hydrophobe Teil des Tetracyclinmoleküls (C5 bis C9) modifiziert werden kann. Dadurch kann die antibiotische Wirksamkeit, die Pharmakokinetik und die Stabilität der Tetracyclinderivate verändert werden. Zu den wichtigsten Modifikationen im Tetracyclinmolekül zählen die strukturellen Abwandlungen an den Kohlenstoffatomen C6 und C7. Durch Modifikationen an diesen Kohlenstoffatomen erhält man die zwei hochwirksamen Tetracycline Doxycyclin und Minocyclin. Beide weisen eine größere chemische Stabilität, eine höhere antibiotische Aktivität und bessere pharmakokinetische Eigenschaften auf [16, 30].

Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik umfasst die Aufnahme eines Arzneistoffes, die Verteilung im Körper, die Metabolisierung und die Ausscheidung.

Die meisten Tetracycline werden oral verabreicht. Nach oraler Applikation variiert die Resorption der verschiedenen Tetracycline. Die älteren Tetracycline, wie Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin, werden nur mäßig gut resorbiert, während die neueren Präparate Doxycyclin und Minocyclin mit einer Rate von über 90 % sehr gut resorbiert werden. Ein Grund dafür ist ihre hohe Lipidlöslichkeit. Die Resorption unterliegt bei allen Tetracyclinen großen individuellen Schwankungen, da sie unter anderem abhängig von dem Füllstand des Magens und der Zusammensetzung der Speisen ist. Tetracycline bilden mit 2- und 3-wertigen Kationen schwer lösliche Chelate. Dadurch wird die Resorption vor allem durch Milch, Milchprodukte, calciumhaltige Vitamintabletten und Eisenpräparate reduziert [31, 32, 33]. Eine Ausnahme bildet dabei das Doxycyclin,

dessen Resorption weitestgehend unabhängig von der Zusammensetzung des Mageninhaltes ist. Zum einen weist es eine geringere Affinität gegenüber Calcium auf, zum anderen sind die gebildeten Metallkomplexe bei sauren pH-Werten nicht stabil [32, 34].

Nach der Resorption verteilen sich die Tetracycline in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie sehr gut in den meisten Geweben und erreichen auch intrazelluläre Erreger wie Chlamydien und Bruszellen [31, 32]. Die höchsten Konzentrationen werden in Niere und Leber gemessen, wodurch sich diese Organe gut für den Nachweis einer Behandlung mit Tetracyclinen eignen [32, 35]. In Knochen und Zahnschmelz kommt es zur Bildung von Tetracyclin-Calcium-Orthosphat-Chelaten. Diese stören das Knochenwachstum und die Dentinbildung [31].

Die Tetracycline unterliegen im tierischen Körper unterschiedlich stark der Metabolisierung. Während Tetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin kaum metabolisiert werden, wird Minocyclin in der Leber zu 6 Metaboliten abgebaut [31, 33]. Auch Chlortetracyclin wird zu einem großen Teil umgewandelt. Zu den Hauptmetaboliten zählen das 4-epi-Chlortetracyclin, das Isochlortetracyclin und das 4-epi-Isochlortetracyclin [36, 37, 38].

Die Exkretion der Tetracycline erfolgt zum größten Teil über die Niere. Nur geringe Mengen werden via Faeces ausgeschieden [31, 34].

2.4 Anwendung in der Veterinärmedizin

Tetracycline sind in der Veterinärmedizin auf Grund ihres breiten Wirkungsspektrums, ihres niedrigen Preises, der geringen Toxizität, ihrer guten Resorption und Verträglichkeit, die am häufigsten eingesetzte Wirkstoffklasse [5].

Sie werden vor allem zur Behandlung bei Infektionen des Gastrointestinaltraktes und des respiratorischen Systems, sowie bei bakteriellen Hautinfektionen, Infektionen des Bewegungsapparates und systemischen Infektionen eingesetzt [5].

Sowohl in der Nutztierhaltung, als auch bei Haustieren finden sie große Anwendung, unter anderem bei Rindern, Schweinen, Schafen, Geflügel, Kaninchen, Fischen, Garnelen,

Pferden, Hunden und Katzen. Die Applikation der Tetracycline erfolgt häufig oral über das Futter oder Wasser der Tiere. Bei Wiederkäuern allerdings muss die Applikation intramuskulär oder intravenös erfolgen, da die orale Gabe der Tetracycline die empfindliche Mikroflora im Wiederkäuermagen stören würde [5].

Der Bundesverband für Tiergesundheit (BfT) hat in den letzten Jahren die Verbrauchsmengen an Veterinärantibiotika in Deutschland über das Veterinärpanel der Gesellschaft für Konsumforschung abgeschätzt. Grundlage für die Abschätzung war eine Stichprobenuntersuchung des Einkaufsverhaltens der niedergelassenen Tierärzte. Diese Werte wurden auf die Grundgesamtheit aller niedergelassenen Tierärzte hochgerechnet. Im Jahr 2005 wurden laut dieser Hochrechnung 784,4 t Veterinärantibiotika eingesetzt. Die Tetracycline machten mit 44,6 % den größten Anteil aus.

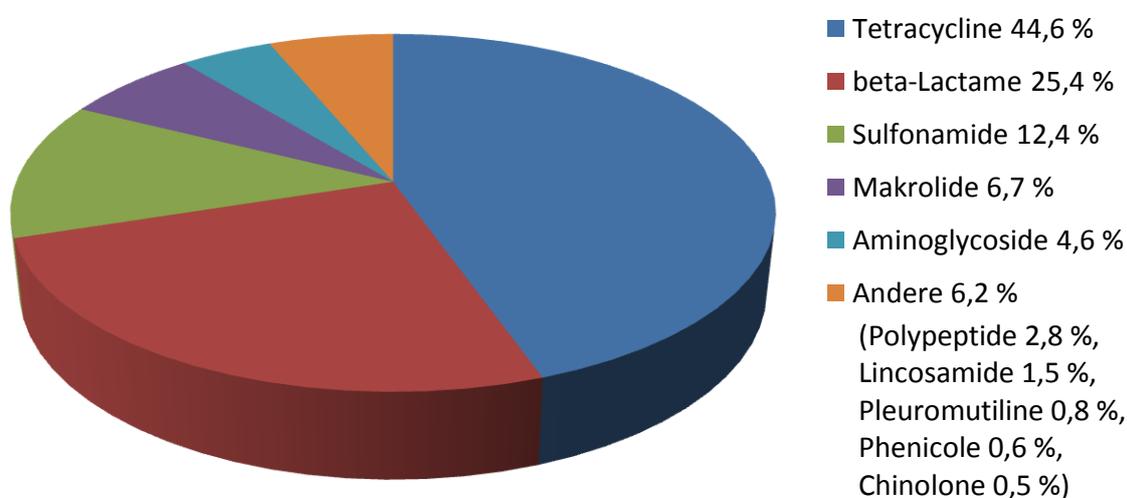


Abbildung 2-10: Abschätzung der Antibiotikaverbrauchsmenge im Veterinärbereich im Jahr 2005 [nach 39]

Allerdings werden bei dieser Abschätzung nicht die Verkäufe über die öffentlichen Apotheken erfasst. Der BfT geht bei seiner Abschätzung von einem Fehler von 10 – 20 % aus [39].

Im Februar 2010 wurde die DIMDI-Arzneimittelverordnung verabschiedet [40]. Danach sind Hersteller und Vertreiber von Tierarzneimitteln verpflichtet, die Abgabe von Stoffen mit antimikrobieller Wirkung an Tierärzte dem Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information zu melden. Die Meldeverpflichtung galt erstmalig für das

Jahr 2011. Die Erfassung soll dazu dienen, mögliche Zusammenhänge zwischen den Mengen an abgegebenen Antibiotika und der Entwicklung von Resistenzen zu erkennen.

Für das Jahr 2011 ergab sich eine Antibiotikaverbrauchsmenge im Veterinärbereich von 1734 Tonnen. Tetracycline stellen auch bei dieser Erhebung mit 576 Tonnen die größte Wirkstoffklasse dar [41].

Tetracycline wirken in niedriger Dosierung leistungsfördernd. Die leistungsfördernde Wirkung von Antibiotika beruht auf ihrer keimtötenden oder -reduzierenden Wirkung. In kleinen, subtherapeutischen Mengen als Zusatz zum Futter führen sie zu einer schnelleren Gewichtszunahme und einer früheren Schlachtreife bei den Tieren. Daher wurden sie in der Geflügel-, Rinder- und Schweinemast für eine bessere Futtermittelverwertung und zum Ausgleich von unzureichenden hygienischen Bedingungen eingesetzt.

Tetracycline sind in der Europäischen Union als Leistungsförderer allerdings nicht zugelassen. Seit 2006 ist es EU-weit endgültig verboten, Antibiotika als Leistungsförderer in der Tierhaltung einzusetzen [3], da die Gefahr besteht, dass sich Resistenzen entwickeln, die auch für den Menschen ein gesundheitliches Risiko darstellen.

2.5 Rechtliche Regelungen

Zum Schutz der Verbraucher vor Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln ist die Verwendung von Tierarzneimitteln durch verschiedene Gesetze geregelt. Die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) mit Sitz in London ist auf europäischer Ebene für Tierarzneimittel zuständig. Sie koordiniert die Überwachung und Bewertung von medizinischen Produkten und ist für zentrale europäische Zulassungen von Tierarzneimitteln verantwortlich. Die zuständige Behörde in Deutschland ist das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Es regelt auf nationaler Ebene die Zulassung und Registrierung von Tierarzneimitteln. Nach §2 (1) und (2) des Arzneimittelgesetzes (AMG) unterliegen Tierarzneimittel, genau wie humanmedizinische Präparate, diesem Gesetz. Die nationale Zulassung der Tierarzneimittel beruht daher auf dem AMG. Dort ist geregelt, dass bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, nur Arzneimittel verwendet werden dürfen, wenn diese für die entsprechende Tierart zugelassen sind [6]. Vor der Zulassung von pharmakologisch wirksamen Stoffen, die bei lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt werden sollen, erfolgt zunächst eine gesundheitliche Risikobewertung, die auf Grundlage der VO (EG) Nr.

470/2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs durchgeführt wird [42]. Dabei werden Rückstandshöchstmengen (maximum residue limit, MRL) für die einzelnen Antibiotika in essbaren Geweben von Tieren, einschließlich Milch und Eiern, festgelegt. Grundlage dafür sind die ADI-Werte. ADI bedeutet „Acceptable Daily Intake“ und gibt die Menge eines Stoffes an, die ein Mensch täglich und lebenslang über Lebensmittel aufnehmen kann, ohne dass ein gesundheitliches Risiko besteht.

In der VO (EU) Nr. 37/2010 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs sind die Höchstmengen für die einzelnen Stoffe festgelegt [7]. Sie dürfen beim Verkauf der Lebensmittel nicht überschritten werden.

In der europäischen Union sind nur die vier Tetracycline Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassen. In Tabelle 2-5 sind die entsprechenden Höchstmengen für die vier Tetracycline aufgeführt.

Tabelle 2-5: Höchstmengen für die vier Tetracycline Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin nach der VO (EU) Nr. 37/2010

Tetracyclin	Markersubstanz	Tierart	Zielgewebe	Höchstmenge [µg/kg]
Chlortetracyclin Oxytetracyclin Tetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittel- erzeugung genutzten Arten	Muskel	100
			Leber	300
			Nieren	600
			Milch	100
			Eier	200
Doxycyclin	Doxycyclin	Rinder	Muskel	100
			Leber	300
			Nieren	600
		Schweine Geflügel	Muskel	100
			Haut und Fett	300
			Leber	300
		Nieren	600	

Während Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin für „alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten“ zugelassen sind, ist Doxycyclin nur für die Behandlung von Rindern, Schweinen und Geflügel zugelassen.

Für die drei Tetracycline Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin sind in allen Zielgeweben dieselben Höchstmengen festgelegt worden. Diese richten sich zum einen nach den Verzehrgewohnheiten des Verbrauchers, zum anderen nach der Pharmakokinetik der einzelnen Antibiotika. Im Gegensatz zu Doxycyclin gelten die Höchstmengen nicht nur für die Muttersubstanz, sondern für die Summe aus der Muttersubstanz und dem 4-Epimer. Das 4-Epimer kann sich im tierischen Metabolismus und bei der Probenaufarbeitung bilden. Da die Epimerisierung bei Doxycyclin nicht beobachtet wird, gilt hier die Höchstmenge nur für die Muttersubstanz.

§ 10 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) regelt, dass die vom Tier gewonnenen Lebensmittel nur in den Verkehr gebracht werden dürfen, wenn die festgesetzten Höchstmengen nicht überschritten sind. Außerdem dürfen sie nur in den Verkehr gebracht werden, wenn die gesetzlichen Wartezeiten eingehalten wurden [43]. Unter Wartezeit versteht man die Zeitspanne zwischen der letzten Verabreichung des Arzneimittels und der Schlachtung oder Vermarktung von Lebensmitteln aus den Tieren. Wartezeiten werden für alle tierischen Produkte festgelegt, für die zuvor eine Höchstmenge bestimmt wurde. Die Festlegung der Wartezeit erfolgt beim Zulassungsverfahren. Die Wartezeit soll garantieren, dass eventuell vorhandene Rückstände unter der festgesetzten Höchstmenge liegen und keine Gefahr für den Verbraucher darstellen. Die Einhaltung der Höchstmenge wird durch den Nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP) überprüft (für eine genaue Beschreibung siehe Kapitel 2.6).

2.6 Kontrolle/ Monitoring

Nationaler Rückstandskontrollplan

Der Nationale Rückstandskontrollplan ist ein seit 1989 jährlich durchgeführtes Programm, in dessen Rahmen Lebensmittel tierischen Ursprungs auf Rückstände unerwünschter Stoffe untersucht werden. Er umfasst alle der Lebensmittelgewinnung dienenden lebenden und geschlachteten Tiere und deren Primärerzeugnisse, wie Milch, Eier und Honig. Er dient dazu, die illegale Anwendung von nicht zugelassenen oder verbotenen Stoffen aufzudecken, die vorschriftsmäßige Anwendung von pharmakologisch wirksamen Stoffen zu kontrollieren und die Belastung mit Umweltkontaminanten zu erfassen.

Grundlage des NRKPs ist neben der Richtlinie 96/23/EG die Entscheidung 97/747/EG [44, 45]. Im nationalen Recht ist der NRKP im LFGB verankert.

Die Durchführung erfolgt in der Europäischen Union nach einheitlichen Kriterien. Es gibt konkrete Vorgaben zu Probenzahl, Probenahme, den zu untersuchenden Stoffen und den anzuwendenden Methoden. Der NRKP wird jährlich von den Ländern mit dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) erstellt. Das BVL ist die koordinierende Stelle und ist neben der Erstellung des NRKP verantwortlich für die Sammlung und die Zusammenfassung der Daten, die Weitergabe der Daten an die Europäische Kommission und die Veröffentlichung der Daten. Die Durchführung des NRKP erfolgt von den Ländern als eigenständige gesetzliche Aufgabe im Rahmen der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung. Die Länder organisieren die Probenahme nach dem NRKP. Die Untersuchungshäufigkeit richtet sich nach den Schlachtzahlen bzw. nach der Jahresproduktion des Vorjahres.

Nach den gesetzlichen Vorgaben ergibt sich jährlich folgende Untersuchungshäufigkeit:

Tabelle 2-6: Jährlicher Untersuchungsumfang im NRKP (nach [46])

Rinder	Jedes 250. geschlachtete Tier
Schweine	Jedes 2000. geschlachtete Tier
Schafe	Jedes 2000. geschlachtete Tier
Geflügel	Eine Probe je 200 Tonnen Jahresproduktion
Aquakulturen	Eine Probe je 100 Tonnen Jahresproduktion
Kaninchen	Eine Probe je 30 Tonnen Schlachtgewicht für die ersten 3000 Tonnen der Jahresezeugung, darüber hinaus eine Probe je weitere 300 Tonnen
Wild/Zuchtwild	Mindestens 100 Proben
Honig	Eine Probe je 30 Tonnen für die ersten 3000 Tonnen der Jahresezeugung, darüber hinaus eine Probe je weitere 300 Tonnen
Milch	Eine Probe je 15.000 Tonnen Jahresproduktion
Eier	Eine Probe je 1000 Tonnen Jahresproduktion

Zusätzlich müssen nach den Vorgaben der Tierischen Lebensmittel-Überwachungsverordnung mindestens 2 % aller gewerblich geschlachteten Kälber und mindestens 0,5 % aller sonstigen gewerblich geschlachteten Huftiere auf Rückstände untersucht werden.

Der NRKP gibt jährlich ein Spektrum von zu untersuchenden Stoffen (Pflichtstoffen) vor. Die Länder, die die Probenahme organisieren, können darüber hinaus bei einer definierten Anzahl von Tieren und Erzeugnissen Untersuchungen frei wählen, und so auf aktuelle und spezielle Gegebenheiten eingehen. Somit erfolgt die Probenauswahl zielorientiert, da Kenntnisse über regionale und örtliche Gegebenheiten berücksichtigt werden und Hinweisen auf unzulässige Tierbehandlung nachgegangen wird.

Im Anhang I der Richtlinie 96/23/EG [44] sind die Stoffe aufgeführt, auf die im Rahmen des NRKPs untersucht wird. Sie werden in die Gruppen A und B unterteilt. Gruppe A besteht aus Stoffen mit anaboler Wirkung und nicht zugelassenen Stoffen, wie z.B. Steroide, β -Agonisten, Nitrofurane und Chloramphenicol. Gruppe B beinhaltet Tierarzneimittel und Kontaminanten. Dazu zählen u.a. Tetracycline, Sulfonamide, Beruhigungsmittel, organische Chlorverbindungen und Mykotoxine.

Im NRKP sind für die zu untersuchenden Stoffe verschiedene Matrices festgelegt, z.B. Urin, Blut, Leber, Niere, Muskel, Haare, Milch, Honig und Eier. Sind für bestimmte Matrices Höchstmengen eines zu untersuchenden Stoffes festgelegt, werden diese Matrices verwendet. Sind keine Höchstmengen vorhanden, werden Matrices verwendet, in denen sich der zu untersuchende Analyt am stärksten anreichert, in denen er die beste Stabilität aufweist und lange nachweisbar ist.

Die Proben werden mittels eines mikrobiologischen Screeningverfahren, dem Dreiplattentest, auf antibakteriell wirksame Stoffe (Hemmstoffe) untersucht. Die Ergebnisse des NRKP in den letzten Jahren zeigen, dass die positiven Hemmstoffbefunde auf einem niedrigen Niveau liegen. In den Jahren 2001 bis 2011 lagen die positiven Befunde in einem Bereich von 0,12 % und 0,33 %. Bei positiv getesteten Proben werden die Wirkstoffe anschließend mit einem Bestätigungsverfahren identifiziert und quantifiziert. Im Jahr 2011 wurden 646 hemmstoffpositive Proben mit einem Bestätigungsverfahren untersucht. Bei 210 Proben (32,5 %) konnten Rückstände oberhalb des MRLs bzw. Rückstände verbotener Wirkstoffe nachgewiesen werden und führten damit zu Beanstandungen.

Die Ursachen für die positiven Hemmstoffergebnisse waren in den letzten Jahren am häufigsten die Tetracycline. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), das die Ergebnisse des NRKP jährlich bewertet, kommt zu dem Schluss, dass auf Grund der

geringen Anzahl von positiven Befunden kein Risiko für den Verbraucher durch antimikrobielle Rückstände in tierischen Lebensmitteln besteht [46, 47].

2.7 Resistenzen

Bakterien besitzen die Fähigkeit, sich schnell mit genetischen Änderungen auf ihr Umfeld einzustellen. Das bietet ihnen die Möglichkeit, auch unter schwierigen und unwirtlichen Bedingungen zu überleben. Fast alle pathogenen Keime haben durch den hohen Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen Resistenzen gegenüber häufig verwendeten Antibiotika ausgebildet [48].

Der in dieser Arbeit verwendete SPR-Assay beruht auf einem Resistenzmechanismus gegenüber Tetracyclinen.

Resistenzmechanismen bei Tetracyclinen

Die bakteriostatische Eigenschaft der Tetracycline wird durch die Inaktivierung der bakteriellen Ribosomen verursacht. Zunächst dringt das Tetracyclin durch die Zytoplasmamembran in die Bakterien ein. Dort bindet es an ein zweiwertiges Kation, wobei Mg^{2+} bevorzugt wird. Das entstandene Chelat bindet an die 30S prokaryontische ribosomale Untereinheit. Die Proteinbiosynthese wird unterbrochen und die Bakterienzelle stirbt ab [48].

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, wie Bakterien Resistenzen gegenüber Tetracyclinen entwickeln können. Zu den vier häufigsten Mechanismen zählen:

- aktives Ausschleusen der Tetracycline (Efflux)
- Bildung von ribosomalen Schutzproteinen
- enzymatische Inaktivierung
- Mutation in der 16S-RNA

Diese vier Mechanismen sollen in den nächsten Abschnitten kurz vorgestellt werden.

Gegenwärtig sind 46 Gene für eine Tetracyclinresistenz identifiziert. Davon codieren 30 für die Efflux-Proteine, 12 Gene codieren für ribosomale Schutzproteine und 3 für ein Enzym, das für die Inaktivierung von Tetracyclin verantwortlich ist. Ein weiteres Gen codiert einen Resistenzmechanismus, der noch nicht aufgeklärt ist [49].

Aktives Ausschleusen (Efflux)

Das aktive Ausschleusen der Tetracycline aus der Zelle ist der häufigste und effizienteste Resistenzmechanismus [50]. Dabei erkennt die Bakterienzelle das Tetracyclin mit hoher Spezifität und schleust es mit Hilfe von Efflux-Pumpen aus, bevor es die Proteinbiosynthese hemmt. Die Induzierung der Synthese dieses Efflux-Proteins bildet die Grundlage für das in dieser Arbeit angewendete Testsystem.

Bei den Efflux-Pumpen handelt es sich um membrandurchspannende Proteine in der Zytoplasmamembran, die durch Protonen angetrieben werden. Ein Proton wird in die Zelle aufgenommen und im Gegenzug ein einfach geladener Magnesium-Tetracyclin-Komplex $[\text{Tc-Mg}]^+$ ausgeschleust. Dadurch wird die Antibiotikakonzentration im Zytoplasma so weit reduziert, dass es zu keiner Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese kommt.

Während Efflux-Pumpen in gramnegativen Bakterien gegen die natürlichen und semisynthetischen Tetracycline, wie Doxycyclin und Minocyclin, wirksam sind, sind sie in grampositiven Bakterien nur gegen die natürlichen Vertreter aktiv [14]. Die Expression der Efflux-Proteine wird zum Schutz der Zelle streng reguliert. Würden sich die Efflux-Pumpen permanent in der Membran befinden, würden auch bei Abwesenheit von Tetracyclinen Protonen in die Zelle aufgenommen werden und das Membranpotential stören [51]. Aus diesem Grund werden die Efflux-Proteine nur bei Anwesenheit von Tetracyclinen exprimiert. Die Expression dieser Proteine muss dabei schon bei Tetracyclinkonzentrationen einsetzen, bei denen die Proteinbiosynthese noch nicht gehemmt wird.

Im folgendem soll die Regulation anhand des Efflux-Proteins TetA näher erläutert werden. In Abbildung 2-11 ist der Mechanismus schematisch dargestellt.

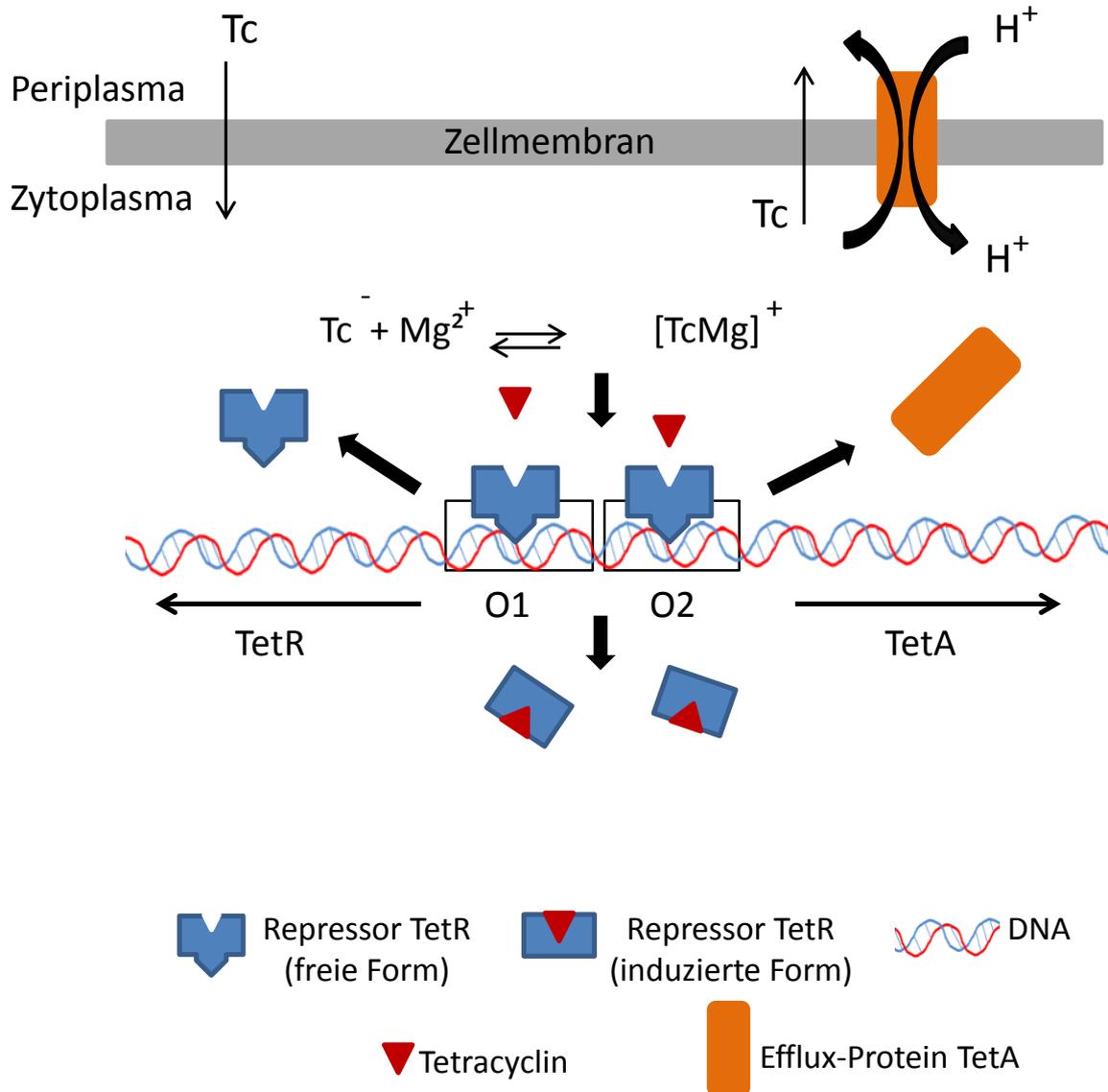


Abbildung 2-11: Resistenzmechanismus einschließlich der Genregulation nach [48]

Die Expression des Efflux-Proteins TetA wird durch ein Protein, den Tetracyclin-Repressor TetR, reguliert. Dieses Protein bindet in Abwesenheit von Tetracyclin an zwei benachbarte DNA-Operator-Bereiche, *tetO1* und *tetO2*. Hinter diesen kurzen Operatorsequenzen sind die codierenden Gene für TetA und TetR angeordnet. Durch die Bindung von TetR an die Operatoren wird die Transkription der beiden Gene blockiert.

Diffundiert Tetracyclin in die Zelle, bildet es mit Mg^{2+} einen Komplex, der mit hoher Affinität an TetR bindet. Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Repressorproteins und es erfolgt die Ablösung des Proteins von der Operatorsequenz. Dadurch kann die Expression der Gene *tetA* und *tetR* erfolgen. Das gebildete Efflux-Protein TetA wird in die Zellmembran eingebaut und schleust den Tetracyclin-Magnesium-Komplex gegen ein Proton aus der Zelle aus.

Das in der Zelle vorhandene Tetracyclin wird durch den Tetracyclin-Repressor gebunden. Da Tetracyclin zum TetR eine 1000fach höhere Affinität als zum Ribosom aufweist, wird die Hemmung der Proteinbiosynthese verhindert [48].

Wenn das gesamte Tetracyclin in der Zelle an TetR gebunden oder ausgeschleust ist, bindet das überschüssige TetR an die zwei Operatorsequenzen *tetO1* und *tetO2* und blockiert dadurch die Expression von TetA und TetR.

Ribosomale Schutzproteine

Sowohl in grampositiven, als auch in gramnegativen Bakterien wurden Gene nachgewiesen, die für ribosomale Schutzproteine codieren [5, 52]. Die Proteine binden an das Ribosom angrenzend an das Tetracyclin. Es kommt zur Ablösung von Tetracyclin. Dieses wird an das Zytosol abgegeben und kann an eine der sechs weiteren weniger spezifischen Bindestellen des Ribosoms binden. Aus diesem Grund führen die Schutzproteine nur bei einer geringen Tetracyclinkonzentration zu Resistenzen [50, 53, 54].

Enzymatische Inaktivierung

Für die enzymatische Inaktivierung wurde bislang nur ein Enzym charakterisiert (TetX). TetX ist eine flavinabhängige Monooxygenase. In Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff hydroxyliert TetX Tetracyclin am Kohlenstoff C11a. Das gebildete Produkt ist sehr instabil und zerfällt bei physiologischen pH-Werten rasch. Durch das Hinzufügen einer Hydroxyl-Gruppe an Position 11a wird der Tetracyclin- Mg^{2+} -Komplex zerstört und verhindert somit die Bindung von Tetracyclin an das Ribosom [55, 56].

Mutation in der 16S-RNA

Die Mutation in der 16S-RNA bewirkt eine selten vorkommende Resistenz. Die Resistenz wird durch den Austausch der Base Cytosin durch Guanin in Position 1058 (*E. coli*) der 16S-RNA verursacht [57].

2.8 Das Operator-Repressor-System

Tetracyclin-Repressor

Bis heute wurden 9 verschiedene Varianten der Tetracyclin-Repressor-Proteine dokumentiert. Sie werden anhand der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz in folgende Gruppen unterteilt: TetR(A) bis TetR(E), TetR(G), TetR(H), TetR(J), TetR(30) und TetR(11). Die einzelnen Varianten zeigen eine Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz von 38-88% [58]. Für die verschiedenen TetR-Varianten liegt die Gesamtlänge der Polypeptidketten zwischen 207 und 218 Aminosäuren [48].

Der Tetracyclin-Repressor liegt als Homodimer, mit zwei identischen Monomeren, vor. Die Monomere sind in zehn α -Helices gefaltet (α_1 - α_{10} beziehungsweise α_1' - α_{10}') und rotationssymmetrisch angeordnet. Sie besitzen zwei N-terminale, DNA-bindende Domänen und eine globuläre, regulatorische Kerndomäne. Die Domänen, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind, werden aus drei-Helix-Bündeln α_1 bis α_3 und α_1' bis α_3' gebildet. α_2 und α_2' sind die Gerüsthelices, während α_3 und α_3' für die Erkennung der DNA verantwortlich sind. Die Helices α_4 und α_4' verknüpfen die DNA-bindende Domäne mit der Kerndomäne und kontrollieren den Abstand der beiden Erkennungshelices [48].

Das Vier-Helix-Bündel aus den antiparallelen Helices α_8 , α_{10} , α_8' und α_{10}' bildet das zentrale Element der Kerndomäne. Die Helices α_5 - α_8 , α_8' und α_9' und die symmetrieäquivalenten Helices α_5' - α_8' , α_8 und α_9 bilden je zwei tunnelartige Bindungstaschen für den Tetracyclin-Magnesium-Komplex. Wird der Komplex gebunden schließt sich α_9 wie eine Schiebetür vor die Bindungstasche und Tetracyclin wird vollkommen eingeschlossen [59].

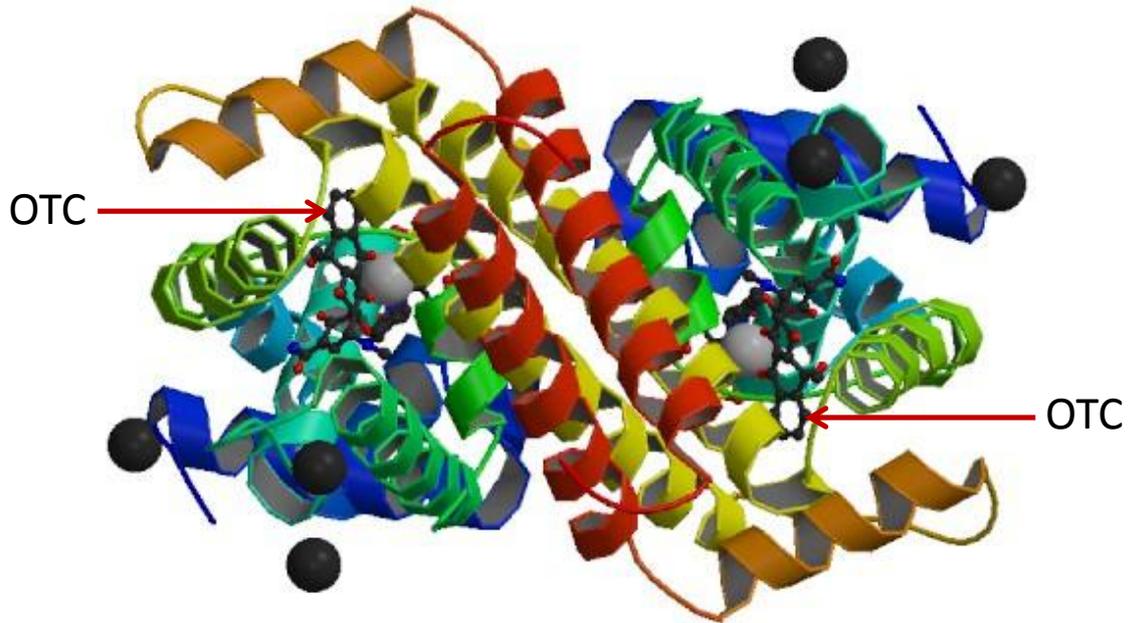


Abbildung 2-12: Struktur des Repressors TetR(D) als Komplex mit zwei Oxytetracyclinmolekülen (OTC) und Mg^{2+} [60].

Tetracyclin-Operator

Die Operatorsequenzen *tetO1* und *tetO2* liegen zwischen den Genabschnitten, die für TetR und *tetA* kodieren, sie sind palindromisch, das bedeutet, dass der komplementäre Strang in gegenläufiger Richtung dieselbe Basenabfolge aufweist. In der Mitte der beiden Sequenzen, auf ihren Symmetrieachsen, liegt ein weiteres Basenpaar, welches nicht palindrom ist. Dieses Basenpaar ist nicht an der Bindung des Tet-Repressors beteiligt.

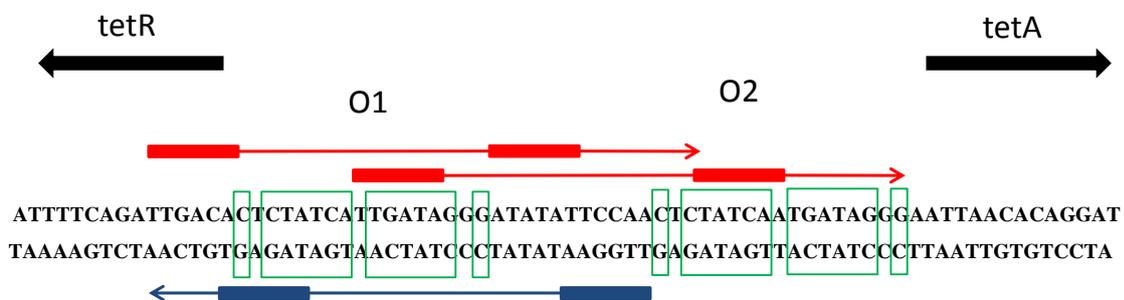


Abbildung 2-13: Nukleotidsequenzen der Operatoren für die Klasse TetR(D) aus dem Resistenzfaktor RA1 nach [48]. Grün umrandet sind die palindromischen Sequenzen hervorgehoben. Die Transkriptionsrichtung der beiden Resistenzdeterminanten *tetR* und *tetA* wird durch die schwarzen Pfeile dargestellt. In rot und blau werden jeweils die Promotoren von *tetA* und *tetR* gezeigt. Die Bindungsregionen für die RNA-Polymerase sind durch die dickeren farbigen Balken dargestellt.

Die Bindung des Tet-Repressors an die Operatoren *tetO1* und *tetO2* erfolgt über die zwei Erkennungshelices α_3 und α_3' , die an zwei benachbarte große Furchen der Operatoren binden. Einen Einfluss auf die Bindung haben die Aminosäuren der α -Helices α_2 und α_3 . Diese bilden spezifische Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Bindungen zu den Basen G2, A3, T4 und T5 aus [48].

Induktion des Repressors durch $[\text{MgTc}]^+$

Dringt Tetracyclin in die Zelle ein, bindet es an den Tet-Repressor und führt zu einer Konformationsänderung und somit zum Ablösen des Repressors von der Operatorsequenz. Es kommt zur Expression des Efflux-Proteins, welches das Tetracyclin aus der Zelle schleust. Die Bindung erfolgt dabei als Komplex mit einem zweiwertigen Kation.

$[\text{MgTc}]^+$ gelangt mit Ring A des Tetracyclins voraus in den Bindungstunnel des Repressors, der durch die Helices α_5 und α_7 und die Schleife $\alpha_6 - \alpha_7$ und α_9 gebildet wird. Dabei kommt es zu einer Verschiebung der α_6 -Helix, die wiederum zu einer Rotation der α_4 -Helix führt. Der Abstand der beiden Erkennungshelices α_3 und α_3' vergrößert sich dadurch um 3 Å. Diese Konformationsänderung führt zu einer Ablösung des Tet-Repressors von der Operatorsequenz, da die Bindungsaffinität von TetR zu *tetO* um 5 – 10 Größenordnungen abnimmt [48].

Bereits bei einer sehr geringen Tetracyclinkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ beginnt dieser Mechanismus in der Bakterienzelle [59].

3. Nachweisverfahren für Tetracycline

Die analytischen Verfahren zum Nachweis von Rückständen können in zwei große Gruppen unterteilt werden, in Screening-Methoden und Bestätigungsmethoden. Screening-Methoden erlauben eine Ja/Nein-Entscheidung, ob Rückstände oberhalb einer bestimmten Konzentration vorhanden sind. In der Regel lassen sie nur gruppenspezifische Nachweise zu. Eine Unterscheidung der einzelnen Tetracycline ist dann nicht möglich. Bei den Bestätigungsmethoden handelt es sich um physikalisch-chemische Verfahren, die eine eindeutige Identifizierung und genaue Quantifizierung nach einem positiven Befund aus einem Screening-Verfahren erlauben. Diese sind für die rechtliche Beurteilung erforderlich. Die Anforderungen und Leistungskriterien der Bestätigungsmethoden sind in einer Entscheidung der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG betreffend die Durchführung von Analysenmethoden (2002/657/EG) vorgegeben [61].

In der Literatur sind viele Screening- und Bestätigungsmethoden für unterschiedliche Matrices beschrieben. Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Matrix Niere untersucht wurde, soll der Schwerpunkt bei den Nachweisverfahren auf dieser Matrix liegen.

3.1 Screening-Methoden

Schon kurz nach der Einführung der Antibiotikatherapie in der Veterinärmedizin wurden Lebensmittel tierischen Ursprungs mittels Screening-Methoden auf Rückstände untersucht. Der erste Einsatz erfolgte in der Milchindustrie, um Problemen bei der Fermentation vorzubeugen. Seit den frühen siebziger Jahren folgte dann auch die Untersuchung von Schlachttieren [62].

Gut geeignete Screening-Methoden sind schnell und einfach durchzuführen und auszuwerten, haben einen geringen Kostenaufwand, eine schnelle Probenaufarbeitung und einen hohen Probendurchsatz.

Die folgenden Abschnitte sollen einen kurzen Überblick über die gebräuchlichsten Screening-Methoden geben.

Mikrobiologische Hemmstofftests

Mikrobiologische Hemmstofftests zählen auch heute noch zu den weitverbreiteten Screening-Methoden für den Nachweis von Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Sie beruhen auf der Hemmung von Stoffwechselaktivität und Vermehrung von Mikroorganismen.

Ein häufig angewendeter Hemmstofftest ist der Blättchentest [63]. Dabei wird ein Filterblättchen, welches zuvor in die Probe getaucht wurde, auf einen mit Bakterien beimpften Nährboden gelegt und für eine bestimmte Zeit bebrütet. Während der Bebrütung zeigt sich auf der gesamten Platte ein dichtes Bakteriumwachstum. Sind jedoch Antibiotika-Rückstände in der Probe vorhanden, so diffundieren diese in den Agar und es bildet sich um die Probe eine Zone, in der die Bakterien nicht wachsen. Diese Zone wird Hemmhof genannt. Bei rückstandsfreien Proben bildet sich kein Hemmhof. Bei Fleischuntersuchungen wird ein kleines Stück der Probe direkt auf einen mit *Bacillus subtilis* versetzten Nährboden gelegt und bebrütet. Dabei werden Nährböden mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Je nach pH-Wert des Nährbodens, auf dem ein Hemmhof entstanden ist, können dann Rückschlüsse auf die Antibiotikagruppe gezogen werden [64].

Für Milch und Milchprodukte sind viele kommerzielle Testsysteme, wie der BRT-Hemmstofftest, der Copan Milk Test, der Delvotest, der Eclipse 100-Test und der Cowside-Test, erhältlich [33, 65, 66, 67, 68, 69].

Für die Matrix Fleisch gibt es hingegen nur eine geringe Anzahl an solchen Testsystemen. Dazu zählen der Premi-Test, der Explorer Test und der KIS (kidney inhibition swab) Test [33, 70, 71, 72]. Bei diesen Tests enthalten die Nährmedien pH- oder Redoxindikatoren für die visuelle Auswertung. So ermöglicht der Premi-Test ein schnelles Screening von Fleisch auf Rückstände verschiedener Antibiotika. Der Nähragar enthält neben dem Bakterium *Bacillus stearothermophilus* den pH-Indikator Bromkresol. Enthält eine Probe keine antibiotischen Rückstände so produziert das Bakterium während der Inkubationszeit Säure. Dies führt zu einem Abfall des pH-Wertes und zu einem Farbumschlag des Indikators von violett nach gelb. Enthält die Probe Rückstände, wird das Bakteriumwachstum gehemmt und keine Säure gebildet. Der Indikator bleibt violett [70].

Hemmstofftests haben verschiedene Vor- und Nachteile. Zu den Vorteilen zählt die einfache Durchführbarkeit dieser Tests. Außerdem wird eine große Anzahl an Wirkstoffen erfasst. Allerdings lassen sich die einzelnen Antibiotikaklassen nicht unterscheiden.

Ein Nachteil ist, dass das Nachweisvermögen vom verwendeten Testkeim abhängt, und für jeden einzelnen Stoff auch innerhalb einer Wirkstoffgruppe sehr unterschiedlich sein kann, so dass kritische Nachweislücken bestehen. Außerdem kann zwischen Antibiotika und anderen Hemmstoffen nicht unterschieden werden. Da nur biologisch aktive Antibiotika das Wachstum der Bakterien hemmen, können mit diesen Tests ebenfalls keine inaktiven Metabolite detektiert werden.

Immunchemische Testsysteme

Eine Vielzahl von immunchemischen Tests zum Nachweis von Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln wurde in den letzten Jahren entwickelt. Grundlage dieser Testsysteme ist eine Antikörper-Antigen-Reaktion. Zur Detektion des Komplexes werden markierte Reagenzien verwendet. Je nach Assayformat und gewünschter Sensitivität sind verschiedene Markierungen möglich.

Bei dem Radioimmunoassay (RIA) wird ein radioaktiv markiertes Tetracyclin eingesetzt und mittels Szintillationsflüssigkeit detektiert [73].

Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung mit fluoreszierenden Substanzen. Unter dem Namen Parallax[®] wird ein kommerzieller solid-phase fluorescence immunoassay (SPFIA) vertrieben. Bei diesem Testsystem wird ein fluoreszenzmarkierter Antikörper zur Detektion verwendet. Obwohl dieses Testsystem für Antibiotikarückstände in Milch entwickelt wurde, konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Tetracyclinen auch in anderen Matrices, wie Fisch, Rinder- und Schweineiere, möglich ist [74, 75].

Bei einem enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) erfolgt die Detektion mit Hilfe von enzymmarkierten Antikörpern. Das Enzym setzt dabei ein Substrat in ein farbiges Produkt um, welches dann detektiert wird. Für die Bestimmung von Tetracyclin gibt es von der Firma R-Biopharm einen kommerziell erhältlichen ELISA (ridascreen[®]). Mit diesem kompetitiven Assay lassen sich Tetracycline in Milch, Honig und Fleisch nachweisen [76].

Bei einer Quantifizierung mit immunchemischen Tests muss die Spezifität des verwendeten Antikörpers beachtet werden. Oft werden strukturell verwandte Analyten

auch zu einem gewissen Anteil gebunden (Kreuzreaktivität). Eine genaue Quantifizierung ist also nur möglich, wenn bekannt ist, welches Tetracyclin in der Probe vorhanden ist.

Rezeptortests

Ein gruppenspezifischer Nachweis von Tetracyclinrückständen ist mit einem Rezeptortest, der gruppenspezifische Rezeptoren nutzt, möglich. Die Rezeptortests sind eng verwandt mit RIA oder ELISA, allerdings werden als Bindungspartner keine Antikörper verwendet. Ein Beispiel ist der Charm II-Test. Dort dient der natürliche Bindungspartner, das bakterielle Ribosom, als Rezeptor. Es handelt sich um einen kompetitiven Test. Als Kompetitor wird radioaktiv markiertes Tetracyclin zu der Probe gegeben und mittels Szintillation der Gehalt an Tetracyclin bestimmt [77].

Ein weiterer kommerziell erhältlicher Rezeptortest ist der Schnelltest Tetrasensor. Bei diesem Schnelltest in Form eines Teststäbchens dient der Tetracyclin-Repressor (TetR) als Bindungspartner. Der Repressor ist mit kolloidalem Gold markiert und wird zu der extrahierten Probe gegeben. In diese Lösung wird das Teststäbchen getaucht. An dem Teststäbchen findet eine chromatographische Abtrennung der Matrixbestandteile statt. In einer bestimmten Höhe ist auf dem Teststäbchen der Tetracyclin-Operator gebunden. Befindet sich kein Tetracyclin in der Probe so liegt TetR frei in der Probenlösung vor und kann an den Operator auf dem Teststäbchen binden. Die Auswertung erfolgt visuell, da durch die Markierung mit kolloidalem Gold eine rote Bande auf dem Stäbchen zu sehen ist. Beide Testsysteme eignen sich zum Nachweis von Tetracyclinen in Milch, Honig und tierischem Gewebe (Muskel, Niere, Leber) [78, 79].

3.2 Chemisch-physikalische Verfahren

Bei einem positiven Befund in einem Screeningverfahren muss das Ergebnis mit einem chemisch-physikalischen Verfahren bestätigt werden. Nur so ist eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von Tetracyclinrückständen möglich.

In der Literatur finden sich zahlreiche unterschiedliche Verfahren zur Bestimmung von Tetracyclinrückständen in tierischen Matrices. Neben dünn-schichtchromatographischen [80] und kapillarelektrophoretischen Methoden [81, 82], werden hauptsächlich HPLC-Verfahren beschrieben. Einen Überblick über verschiedene HPLC-Verfahren gibt Literatur [83].

Extraktion und Aufreinigung der Proben

Bevor die Tetracycline mittels HPLC analysiert werden können, müssen sie aus der Matrix isoliert werden. Auf Grund ihrer Eigenschaften gestaltet sich die Extraktion besonders aus tierischen Matrices, wie Muskel und Niere, schwierig. So muss bei der Extraktion beachtet werden, dass die Tetracycline unter sauren und alkalischen Bedingungen, sowie unter UV-Strahlung nicht stabil sind. Zudem besitzen sie stark komplexbildende Eigenschaften und binden leicht an Proteine aus der Probenmatrix [84].

Als Extraktionspuffer werden vor allem Puffer mit einem niedrigen pH-Wert (pH 4-5) verwendet. Neben Oxalatpuffer wird hauptsächlich EDTA-Mc-Ilvaine-Puffer (pH 4) zur Extraktion eingesetzt [85, 86]. Dies ist ein Citrat/Phosphatpuffer, der den Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält. Dadurch werden Tetracycline, die an Metallkationen gebunden sind, aus diesen Komplexen gelöst.

Das in der Literatur am häufigsten beschriebene Clean-up-Verfahren ist die Festphasenextraktion. Neben der Aufreinigung findet hierbei auch eine Anreicherung der Analyten statt. Bei den vielfach verwendeten C8- und C18-Phasen können die Tetracycline an vorhandene freie Silanolgruppen binden und dadurch nicht vollständig eluiert werden. Ein Zusatz von EDTA zum Puffer kann Abhilfe schaffen [85, 87].

Für weitere in der Literatur beschriebene Verfahren zur Probenaufreinigung sei auf die Übersichtsartikel von Oka et al., Anderson et al. und Barker et al. verwiesen [83, 84, 88].

Chromatographische Trennung und Detektion

Einen Überblick über verschiedene chromatographische Verfahren zur Trennung der Tetracycline gibt Literatur [83]. Die Trennung erfolgt in der HPLC fast ausschließlich an RP-Phasen (reversed-phase). Um die zuvor beschriebenen Wechselwirkungen mit den freien Silanolgruppen zu verhindern, werden Säulen mit Endcapping verwendet oder der mobilen Phase komplexbildende Substanzen, wie Oxalsäure, zugesetzt.

Da sich Oxalsäure nicht vollständig verdampfen lässt, eignet sich dieses Vorgehen nicht bei der massenspektrometrischen Detektion. Werden Massenspektrometer zur Detektion genutzt, werden häufig Fließmittelgemische aus Methanol oder Acetonitril mit Wasser und Ameisensäure oder Mischungen aus Acetonitril, Methanol und wässriger Trifluoressigsäure verwendet [87, 89, 90].

Zur Detektion werden Diodenarray-Detektoren [85], UV-Detektoren [91], Fluoreszenz-Detektoren [28, 91] und Massenspektrometer genutzt [87, 90]. Auf Grund der sehr hohen Empfindlichkeit und Selektivität sind die klassischen optischen Detektionsverfahren von der massenspektrometrischen Detektion abgelöst worden. Für eine Übersicht über verschiedene massenspektrometrische Verfahren zum Nachweis von Tetracyclinen in tierischen Matrices sei auf Literatur [89] verwiesen. Seither hat es umfangreiche Entwicklungen und eine Vielzahl von neuen MS-Methoden auf diesem Gebiet gegeben.

4. Nachweis mittels Biosensorverfahren

Neben den zuvor beschriebenen Verfahren, haben in den letzten Jahren in der Lebensmittelanalytik die Biosensorverfahren an Bedeutung gewonnen [93].

Biosensoren bestehen aus einem für den Analyten spezifischen Bindungspartner und einem Messwandler (Transducer). Der Bindungspartner ist am Transducer immobilisiert. Bindet der Analyt an seinen Bindungspartner, wandelt der Transducer das dadurch entstehende biologische Signal in ein elektrisches Signal um. Als Bindungspartner können Enzyme, Antikörper, Nucleinsäuren aber auch bakterielle, pflanzliche und tierische Zellen dienen. In der Bioanalytik finden elektrochemische, thermische, akustische und optische Transducer Verwendung [94, 95].

4.1 Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) zählt zu den optischen Biosensoren.

Das Messprinzip eines SPR-Biosensors beruht auf der Oberflächenplasmonresonanz. Als Plasmon bezeichnet man ein Quant von elektromagnetischen Wellen des Elektronengases in einer Metallschicht. Wenn sich die Wellen parallel zu einer Oberfläche ausbreiten, spricht man von Oberflächen-Plasmon-Wellen (SP-Wellen). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, SP-Wellen anzuregen [96, 97]. Da der in dieser Arbeit verwendete SPR-Biosensor auf der Kretschmann-Raether-Konfiguration basiert, wird nur auf diese experimentelle Anordnung zur Erzeugung von SP-Wellen eingegangen.

Grundlage für die Anregung von Oberflächenplasmonen ist die Totalreflexion an einem Prisma. Diese tritt auf, wenn p-polarisiertes Licht (Licht, dessen Polarisationssebene parallel zur Einfallsebene liegt) in einem Winkel oberhalb des Winkels der Totalreflexion auf die Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren und einem optisch dünneren Medium trifft. Der Lichtstrahl wird dann in das optisch dichtere Medium vollständig reflektiert. Obwohl das Licht an der Grenzfläche reflektiert wird, breiten sich elektromagnetische Wellen des Lichts hinter die reflektierende Oberfläche hinaus aus. Die Intensität der elektromagnetischen Welle nimmt dabei in senkrechter Richtung zur Grenzfläche exponentiell ab. Man bezeichnet dies als evaneszente Welle oder als evaneszentes Feld [98].

Ist auf die Grenzfläche des Prismas eine dünne Metallschicht (z.B. eine Goldschicht) aufgebracht, dringt die evaneszente Welle ca. $\frac{1}{4}$ der Wellenlänge in die Metallschicht ein. In den meisten Fällen wird eine Goldschicht verwendet, da Gold nur wenig anfällig gegen Oxidationen ist. Außerdem ist es gegen Lösungen, die bei biochemischen Analysen verwendet werden, chemisch inert. Sind die Resonanzbedingungen erfüllt, können Photonen in Oberflächenplasmonen umgewandelt werden. Diese sind nur dann erfüllt, wenn das Moment und die Energie von Photonen und Plasmonen erhalten bleiben. Da die Ausbreitung der Plasmonen auf die ca. 50 nm dicke Metallschicht begrenzt ist, ist nur die Vektorkomponente parallel zur Oberfläche entscheidend. Wenn der Betrag der Vektorkomponente identisch mit dem Betrag des Moments des Plasmons ist, sind die Voraussetzungen erfüllt und es kommt zur Plasmonresonanz. Die Plasmonen in der Metallschicht erzeugen selbst ein evaneszentes Feld, das sich in das angrenzende Medium weiter ausbreitet. Die Ausbreitungstiefe liegt bei ca. 400 nm [99].

Durch die Verwendung von monochromatischem Licht werden die Resonanzbedingungen nur für einen bestimmten Einfallswinkel erfüllt. Dieser wird als SPR-Winkel oder Resonanzwinkel bezeichnet. Durch die Anregung der Oberflächenplasmonen wird nur ein Teil des Lichtes remittiert und die Intensität des reflektierten Licht verringert sich, so dass bei dem entsprechenden Ausfallwinkel ein Intensitätsminimum auftritt.

Der Winkel des Intensitätsminimums (Θ_{SPR}) hängt von mehreren Faktoren ab: den optischen Eigenschaften des Prismas, Art und Dicke der Metallschicht, Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes und dem Brechungsindex der Lösung, die in Kontakt mit der Metalloberfläche steht [97, 100]. Dabei ist zu beachten, dass die Änderung des Brechungsindex nur innerhalb des evaneszenten Feldes detektiert werden kann. Darüber hinaus haben Änderungen keinen Einfluss auf den SPR-Winkel. Eine Änderung in der Umgebung der Metallschicht führt damit zu einer Änderung der Resonanzbedingungen und somit zu einer Verschiebung des SPR-Winkels. Ändert sich z.B. die Masse an der Metalloberfläche durch die Bindung eines Analyten an den Liganden, führt dies zu einer Änderung der Resonanzbedingungen und der Resonanzwinkel ändert sich.

In Abbildung 4-1 ist schematisch die Detektionseinheit eines SPR-Spektrometers dargestellt:

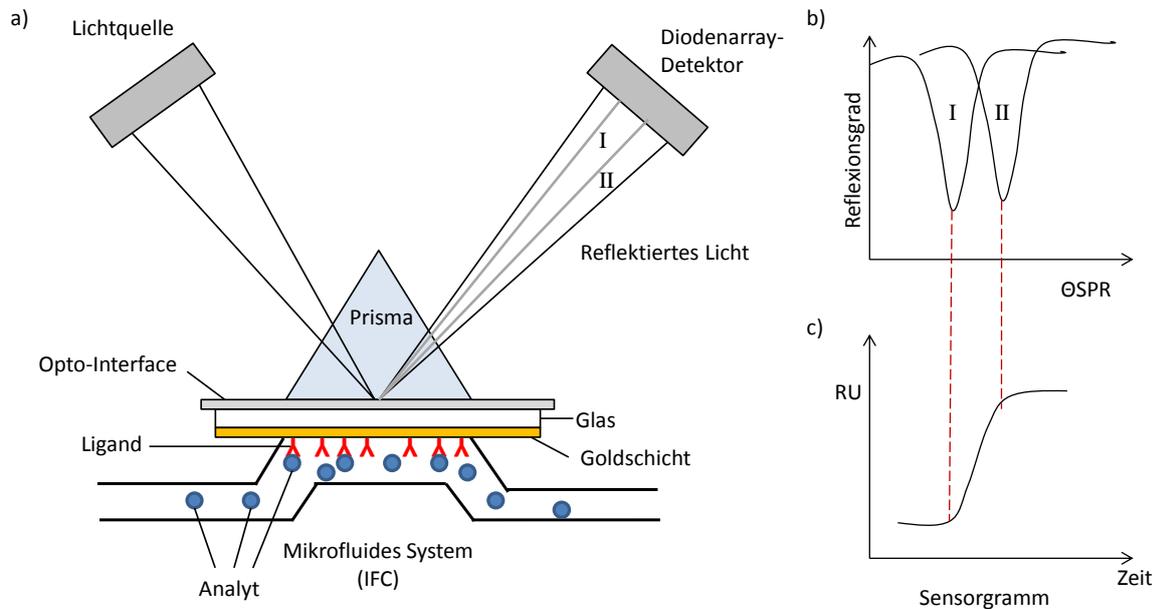


Abbildung 4-1: (a) Monochromatisch, p-polarisiertes Licht wird durch ein Prisma auf die Goldoberfläche des Sensorchips fokussiert. An der Chipoberfläche sind die Bindungspartner des Analyten immobilisiert. Die Chipoberfläche grenzt an das Flusssystem, durch das Puffer, gelöste Analyten und Regenerationslösung fließen. Bindet der Analyt an den Bindungspartner ändert sich der Brechungsindex und damit auch der Winkel des SPR-Minimums (b). Die Änderung ist im Sensorgramm (c) als Signalerhöhung zu sehen [101].

Während der SPR-Analyse wird der SPR-Winkel kontinuierlich in Echtzeit aufgenommen. Er wird gegen die Zeit aufgetragen und als „Sensorgramm“ von der Software ausgegeben (siehe Abbildung 4-1 c). Die Änderung des Winkels wird in der Einheit „Resonance units“ (RU) angegeben, wobei 1 RU einer Winkeländerung von $0,0001^\circ$ entspricht [100]. Erfolgt eine Bindung der Analyten an die Chipoberfläche erhält man positive ΔRU -Werte, bei einer Ablösung erhält man negative ΔRU -Werte.

Aufbau eines Biosensors

SPR-Spektrometer werden in unterschiedlichen Ausführungen von unterschiedlichen Herstellern angeboten. In der vorliegenden Arbeit wurde das SPR-Spektrometer Biacore Q der Fa. Biacore International AB (heute GE Healthcare) verwendet. Zum besseren Verständnis soll der Aufbau des Spektrometers an dieser Stelle erläutert werden. In Abbildung 4-2 ist der schematische Aufbau eines Biacore Q-Gerätes dargestellt. Eine

Zusammenstellung über weitere kommerziell erhältliche SPR-Biosensoren findet sich in der Literatur [102] und [103].

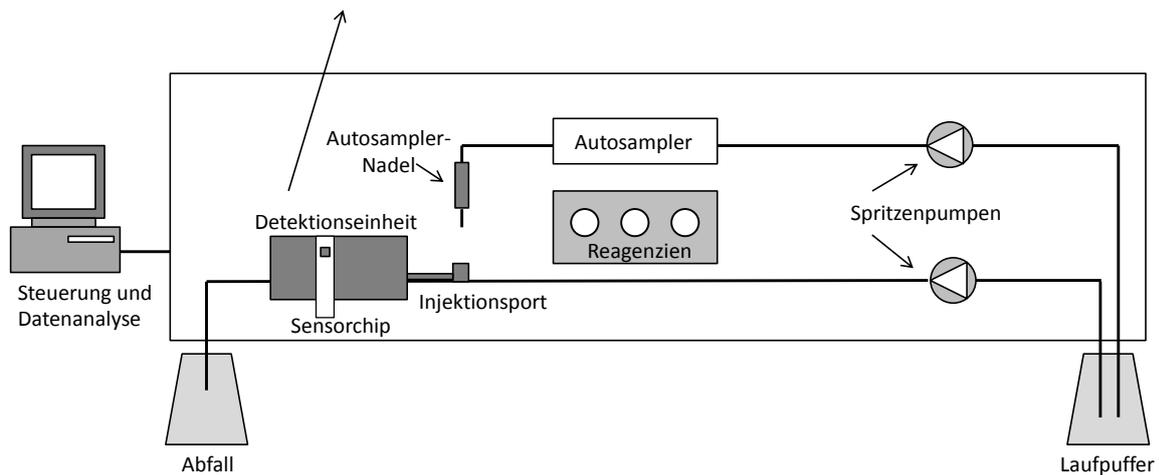
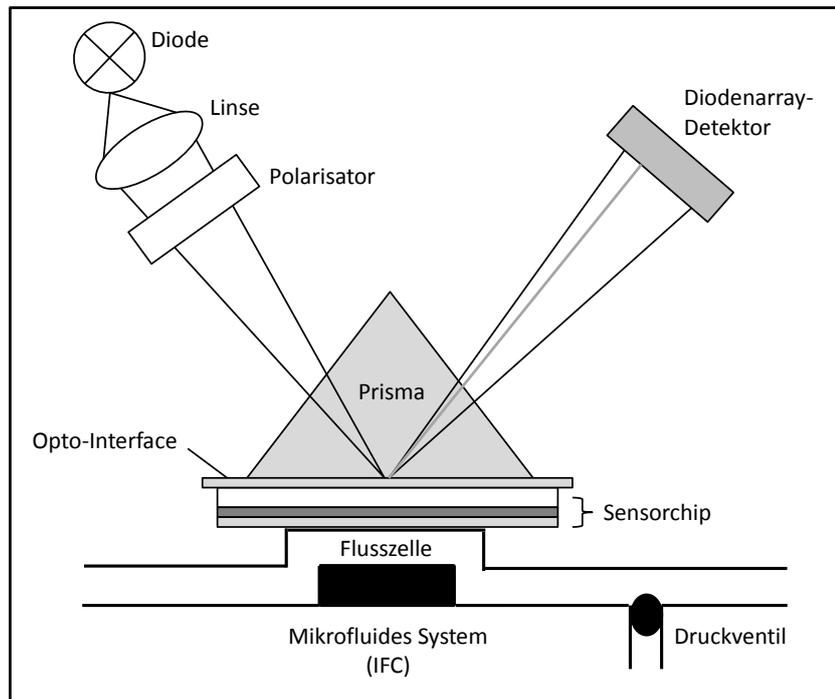


Abbildung 4-2: Schematischer Aufbau des SPR-Spektrometers Biacore Q (modifiziert nach [104])

Von zentraler Bedeutung ist die thermisch isolierte und thermostatisierte Detektionseinheit mit dem mikrofluiden System. Die Temperatur in der Detektionseinheit wird durch Peltier-Elemente reguliert und durch kontinuierliche Luftzirkulation konstant auf 25,0°C gehalten [105].

Über eine dünne Silikonfolie (Opto-Interface) ist der Sensorchip (siehe nächster Abschnitt) mit der Glasseite mit dem Prisma verbunden. Die Folie, deren Brechungsindex auf das Glasprisma abgestimmt ist, garantiert einen genauen optischen Kontakt zwischen dem Sensorchip und dem Prisma [100]. Als Lichtquelle dient eine LED (Light emitting diode, 760 nm) [105]. Der Lichtstrahl wird keilförmig auf die Glasseite des Sensorchips fokussiert und das reflektierte Licht durch einen Diodenarray-Detektor (DAD) registriert. Der Abstand der Dioden entspricht einer Winkeländerung von $0,1^\circ$. Mit Hilfe der angeschlossenen computergestützten Datenverarbeitung wird die Detektionsgenauigkeit durch Interpolation des DAD-Signals auf 10^{-4} verbessert [100].

Über zwei pulsationsfreie Spritzenpumpen wird das System mit Laufpuffer oder anderen Reagenzien versorgt. Während die eine Pumpe kontinuierlich den Laufpuffer durch das System fördert, injiziert die zweite Pumpe die Proben mittels eines Autosamplers über den Connector-Block in das mikrofluide System (Integrated μ -Fluidic Cartridge, IFC). Je nach Bedarf wechselt das System automatisch zwischen den beiden Pumpen.

Die IFC ist aus Silikon gefertigt und besteht aus einer Reihe von Kanälen und pneumatischen Ventilen. Sie dient dem Transport von Flüssigkeiten zur Flusszelle hin und zurück. Über die Ventile wird gesteuert, welche Kanäle der IFC mit welchen Reagenzien gefüllt werden (Laufpuffer, Probelösung etc.). Die pneumatischen Ventile werden durch Luftdruck über einen internen Kompressor gesteuert. Um eine Diffusion der Luft in die Flusszellen zu verhindern, sind die Kanäle für die Druckluft mit Glycerin gefüllt [105]. Das Glycerin ist grün eingefärbt, so dass man beim Ausbau der IFC schnell erkennen kann, ob diese noch einwandfrei funktioniert. Dringt in einen Kanal zwischen Glycerin und pneumatischen Ventil Luft, können die Ventile nicht mehr exakt angesteuert werden. Das kann zur Folge haben, dass z.B. die Kontaktzeiten der einzelnen Lösungen von Zyklus zu Zyklus stark variieren und die Injektionen verzögert beginnen, wodurch man keine reproduzierbaren Ergebnisse erhält. Ist in einem Kanal Luft zwischen Ventil und Glycerin eingedrungen, muss die komplette IFC ausgetauscht werden.

An der Oberfläche der IFC ist ein Flusszellen-Block mit 4 Kanälen angebracht. Beim Einbau des Sensorchips in das SPR-Spektrometer wird der Chip gegen die IFC gedrückt, so dass vier parallel angeordnete Flusszellen mit einem Volumen von 60 nL entstehen. Je nach Gerätetyp können die Flusszellen einzeln, in Reihe oder paarweise angesteuert werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Biacore Q-Gerät können die Flusszellen nur

einzelnen angesteuert werden, so dass eine zeitgleiche Messung auf mehreren Flusszellen nicht möglich ist [104].

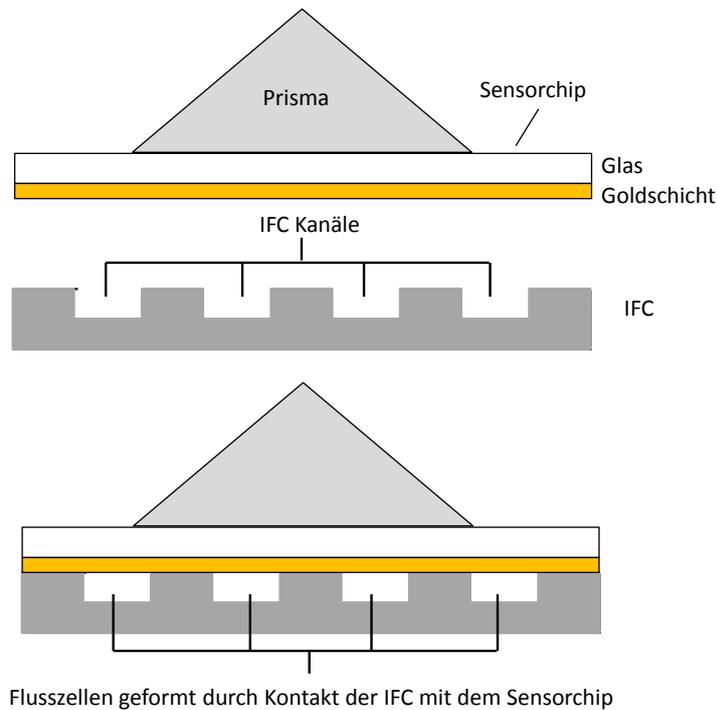


Abbildung 4-3: Querschnitt durch die IFC. Bildung der vier Flusszellen durch Kontakt der IFC mit dem Sensorchip (modifiziert nach [106])

Proben und Reagenzien werden mittels eines Autosamplers über den Connector-Block in die IFC injiziert. Der Connector-Block verfügt über zwei Eingänge. Über einen Eingang wird die IFC mit Laufpuffer versorgt, der zweite Eingang dient zum Injizieren von Proben und Reagenzien über die Autosamplernadel. Des Weiteren verfügt der Connector-Block über eine „Waschstation“. Dort wird die Autosamplernadel nach jeder Injektion von innen und außen mit Puffer gewaschen, um Verschleppungen zu vermeiden.

Mit einer Software wird das komplette System gesteuert und ermöglicht so eine vollautomatische Analyse. Bei der Programmierung des Systems können viele Parameter variiert werden, wie zum Beispiel der Fluss des Laufpuffers, die Flussrate bei der Injektion und das Injektionsvolumen, während einige Systemparameter nicht beeinflussbar sind. Dazu zählen vorbereitende und abschließende Waschstritte vor und nach jedem Zyklus und den einzelnen Injektionen.

Am Ende jeder Analyse schaltet das System automatisch in den Standby-Modus. Dabei wird das System kontinuierlich mit Laufpuffer gespült (5 µl/min) um ein Austrocknen der Sensoroberfläche und das Ausfallen bzw. Kristallisieren von Pufferbestandteilen im mikrofluiden System zu vermeiden.

Sensorchips

Das zentrale Element der SPR-Analytik ist der austauschbare Sensorchip. Er besteht in der Regel aus dem Trägermaterial, dem Haftvermittler, der Immobilisierungsmatrix und dem immobilisierten Liganden. In Abbildung 4-4 ist der schematische Aufbau eines Sensorchips ohne Ligand dargestellt.

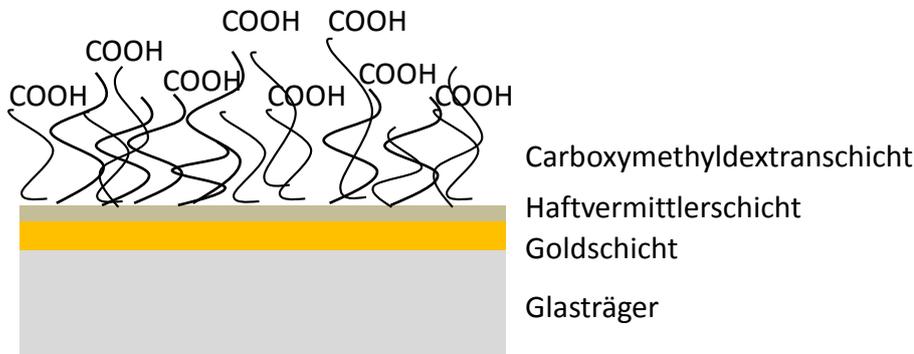


Abbildung 4-4: Schematischer Aufbau eines Sensorchips mit Carboxymethyl-dextran-Schicht

Auf dem Trägermaterial (z.B. Glas) ist ein dünner Metallfilm (ca. 50 nm), in der Regel Gold, aufgebracht. Dieser ermöglicht die Bildung von Oberflächenplasmonen. Es folgt die Haftvermittlerschicht, die eine stabile Verbindung zwischen der Goldschicht und der Immobilisierungsmatrix schafft. Sie schirmt die Goldoberfläche vor Puffer- und Probelösung ab, und verhindert so unspezifische Wechselwirkungen von Proteinen oder anderen Matrixbestandteilen an der Metallschicht. Die Haftvermittlerschicht ist zwischen 2 und 5 nm dick. In diesem Bereich erhält man stabile Beschichtungen, ohne dass die Empfindlichkeit des Biosensors abnimmt. Häufig werden Alkylthiole als Haftvermittler eingesetzt. Es folgt die Immobilisierungsmatrix, an der die Liganden gebunden werden, die wiederum selektiv mit den Analyten wechselwirken [103].

Sensorchips gibt es mit verschiedenen Oberflächentypen, so dass je nach analytischer Anforderung der entsprechende Sensorchip gewählt werden kann. Die gebräuchlichsten Sensorchips haben eine Carboxymethyl-dextran-Oberfläche wie sie in Abbildung 4-4 dargestellt ist. Im gequollenen Zustand ist die Carboxymethyl-dextran-Schicht ca. 100 nm hoch. Über die Carbonsäuregruppen des Dextrans können die Liganden mit geeigneten Kopplungsreagenzien kovalent gebunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Streptavidin (SA)-Chips verwendet. SA-Chips besitzen eine Carboxymethyl-dextranoberfläche an die kovalent Streptavidin gebunden ist. Streptavidin ist ein Protein, das von *Streptomyces avidinii* produziert wird und eine hohe Affinität zu Biotin ($K_D=10^{-15}$ M) aufweist. Dadurch ist es möglich, biotinylierte Liganden mittels Einfangverfahren an den Chip zu immobilisieren. Die Bindung Streptavidin-Biotin ist so stark, dass bei der Regeneration der Analyt entfernt wird, während der biotinylierte Ligand an der Chipoberfläche verbleibt.

Einsatz

Das Spektrum der Analyten, die sich mittels SPR-Verfahren nachweisen lassen, umfasst Vitamine, Mykotoxine, Hormone, Proteine, Bakterienzellen und Tierarzneimittelrückstände. Über die Anwendung von Biosensoren in der Lebensmittelanalytik gibt Literatur [107] einen Überblick.

Ein wichtiger Vorteil von Biosensoren ist, dass die Ligand/Analyt-Wechselwirkung in Echtzeit verfolgt werden kann, ohne einen der beiden Reaktionspartner zu markieren [108]. Außerdem ist bei den meisten Analysen keine aufwendige Probenvorbereitung oder chemische Derivatisierung notwendig. Zudem handelt es sich um automatisierte Verfahren, so dass ein hoher Probendurchsatz in kurzer Zeit möglich ist. Aus diesen Gründen werden Biosensoren seit einigen Jahren vermehrt in der Lebensmittelanalytik, z.B. im Rahmen der Prozesskontrolle bei der Herstellung von Lebensmitteln, eingesetzt [109].

Ein weiterer wichtiger Vorteil der SPR ist die Möglichkeit, den Sensorchip innerhalb weniger Minuten zu wechseln, so dass in kurzer Zeit ein anderer Analyt nachgewiesen werden kann. Dieser schnelle Wechsel der Sensorchips erlaubt die Analytik von mehreren Substanzen innerhalb eines Tages.

4.2 Rückstandsanalyse

Aus den oben genannten Gründen werden SPR-Verfahren auch immer häufiger in der Rückstandsanalyse von Tierarzneimitteln angewendet. Unter anderem gibt es Verfahren für den Nachweis von Sulfonamiden [110], β -Lactam-Antibiotika [111, 112], Tylosin [113] und Aminoglycosiden [114, 115].

Eine übersichtliche Zusammenstellung von beschriebenen SPR-Verfahren für die Analytik von Tierarzneimittelrückständen gibt es in Literatur [116], [117] und [118].

Von der Fa. Biacore International AB gibt es eine Reihe von kommerziell erhältlichen Testsystemen, die speziell für das SPR-Spektrometer Biacore Q entwickelt wurden (QFlex kits). Unter anderem gibt es Testsysteme für Sulfonamide, Streptomycin, Chloramphenicol, Vitamin B₂ und B₁₂. Die Testsysteme sind für eine Reihe verschiedener Matrices, wie Milch, Honig, Niere, Muskelfleisch und Krustentiere geeignet. Eine Auflistung erhältlicher QFlex kits und die dazugehörigen Nachweisgrenzen geben Literatur [103] und [33]. Diese kommerziellen Testsysteme haben die Vorteile, dass sie mittels der Software leicht zu programmieren und auszuwerten sind, keine fluoreszierenden oder radioaktiven Marker erforderlich sind und eine simple und schnelle Probenvorbereitung haben. Darüber hinaus enthalten diese Testkits schon vorimmobilisierte Sensorchips, die sich leicht regenerieren und wiederverwenden lassen. Dies führt zu einem geringeren Arbeitsaufwand und zu standardisierten Chipoberflächen, mit denen man auch über hundert Analysen lang reproduzierbare Daten erhält.

Biosensoren für den Nachweis von Tetracyclinen

Für den Nachweis von Tetracyclinen sind in der Literatur verschiedene Biosensor-Verfahren beschrieben.

Korpela et al. haben 1998 ein Biosensor-Verfahren vorgestellt, das den Regulationsmechanismus für die Expression von Effluxproteinen bei Tetracyclin nutzt [119]. Kurittu et al. nutzten den beschriebenen Biosensor zum Nachweis von Tetracyclinrückständen in Rohmilch. Für das Testsystem stellten sie auf einem synthetischen Plasmid Luciferase-Gene, die für die Ausbildung einer Biolumineszenz nötig sind, unter die Kontrolle des Tetracyclin-Repressor-Operator-Systems. Nachdem das Plasmid in E.coli transformiert wurde, wurde dieser als Detektionskeim zu Milchproben gegeben. Bei Anwesenheit von Tetracyclinen löst sich der Repressor vom Operator und die

Luciferase-Gene können abgelesen werden. Es kommt zur Biolumineszenz der Probe, die umgekehrt proportional zu der Menge an Tetracyclin ist [120].

Das beschriebene Testsystem wurde auch mit dotierten Proben für die Matrices Fisch und Geflügel getestet [121, 122]. Pikkemaat et al. veröffentlichten 2010 die Ergebnisse ihrer Arbeit, bei denen das Testsystem an gewachsenem Material getestet wurde. Dazu wurden 337 Geflügelproben aus einem nationalen Monitoringprogramm untersucht. Es zeigte sich, dass es mit diesem Testsystem möglich ist, Tetracyclinegehalte weit unter dem MRL nachzuweisen [123].

Hohe Tetracyclinkonzentrationen in der Probe führen bei diesem Testsystem zu Problemen, da sie die Proteinbiosynthese des Bakteriums und damit auch die Expression des Reportergens hemmen. Daher können Proben mit einem hohen Tetracyclinegehalt negative Ergebnisse vortäuschen. Um falsch negative Ergebnisse bei hohen Tetracyclin-Konzentrationen zu verhindern, stellten Pikkemaat et al. je drei Verdünnungen der Proben für die Messung her [123].

Bahl et al. lösten das Problem, indem sie ein Plasmid verwenden, das zusätzliche zum Reportergen auch ein Gen für ein ribosomales Schutzprotein enthält. Dieses Gen wird bei Anwesenheit von Tetracyclin exprimiert. Dadurch wird das Ribosom vor einer Hemmung durch Tetracyclin geschützt und das Reportergen weiter gebildet [124].

Im Jahr 2004 wurde von Pellinen et al. ein zellfreier Biosensor beschrieben, der auf dem gleichen Prinzip beruht. Im Unterschied zu den Experimenten von Kurittu et al. wird die Transkription im zellfreien Extrakt durchgeführt. Durch dieses Vorgehen konnte die Inkubationszeit zum einen deutlich verringert, zum anderen die Nachweisempfindlichkeit verbessert werden [125].

SPR-Assay für Tetracycline

Von Garnier gibt es ein Patent für den Tetrasensor-Schnelltest. Dort wird ein SPR-Verfahren erläutert, das auf einem Resistenzmechanismus gegenüber Tetracyclinen beruht. Dabei dient der TetR-*tetO*-Komplex als Grundlage [126]. Die Probe wird mit Repressor (TetR) und Operator inkubiert. Als Operator dient eine biotinylierte doppelsträngige DNA. Ist in der Probe Tetracyclin vorhanden, löst sich der Repressor vom Operator. Bei Abwesenheit von Tetracyclin bleibt der Repressor-Operator-Komplex hingegen bestehen. Nach der Inkubation erfolgt die Injektion. Nach der Beschreibung im Patent kann nur die freie DNA an das Streptavidin binden. Warum aber die DNA, die sich im Komplex mit

TetR befindet, nicht imstande ist, an den Sensorchip mit Streptavidin zu binden, wird in der Patentschrift nicht erklärt. Es wird auch nicht erläutert, wie die Sensorchipfläche regeneriert werden soll. Dazu müsste der sehr stabile Streptavidin-Biotin-Komplex (Affinitätskonstante $K_A = 10^{15}$ L/mol) getrennt werden.

Von Möller et al. wird ein SPR-Assay zum Nachweis von Tetracyclinen in Milch und Honig beschrieben [127]. Dieser beruht auch auf dem TetR-*tetO*-Komplex und dient als Grundlage für die vorliegende Arbeit (für eine genaue Beschreibung des Testsystems siehe Kapitel 6.1).

Ein indirekt-kompetitiver SPR-Assay mit Doxycyclinderivaten wurde von Andree et al. vorgestellt [128]. Dabei werden die Doxycyclinderivate an die Chipoberfläche immobilisiert und TetR mit der zu analysierenden Probe gemischt. Anschließend wird diese Mischung über den Sensorchip gegeben. Ist Tetracyclin in der Probe vorhanden, bindet es an den Repressor. Dadurch steht der Repressor nicht mehr für eine Bindung mit den immobilisierten Doxycyclinderivaten zur Verfügung, d.h. je mehr Tetracyclin in der Probe vorhanden ist, desto weniger Rezeptorprotein bindet an die Chipoberfläche.

5. Zielsetzung

In einer zuvor durchgeführten Arbeit wurde von Möller ein SPR-Assay zum Nachweis von Tetracyclinen in Milch und Honig entwickelt. Dabei handelte es sich um ein nicht-kompetitives Screening-Verfahren, das den TetR-*tet*O-Komplex nutzt [129].

In einer weiterführenden Arbeit von Andree wurde dieses Testsystem für Honig optimiert und das Potential für eine kommerzielle Verwendung untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Robustheit und Stabilität des Testsystems mit den verwendeten Reagenzien und Sensorchips [130].

Für eine kommerzielle Nutzung des Screening-Verfahrens sind aber auch weitere Matrices wie Niere, Leber und Muskelfleisch von großem Interesse. In der Europäischen Union sind für die vier zugelassenen Tetracycline gesetzliche Höchstmengen festgesetzt. Diese liegen für Muskelfleisch bei 100 µg/kg, für Leber bei 300 µg/kg und für Niere bei 600 µg/kg. Sie gelten für die Summe von Muttersubstanz und das 4-Epimer [7].

Ziel dieser Arbeit war es, das vorhandene Testsystem auf die tierischen Matrices Niere und Muskelfleisch zu übertragen und eine geeignete Aufarbeitungsmethode für das Probenmaterial zu finden. Dabei sollte der Schwerpunkt auf der Matrix Niere liegen. Nieren sind ein wichtiges Ausscheidungsorgan für Fremdstoffe wie Antibiotika. Auch Tetracycline werden hauptsächlich über die Niere ausgeschieden. Daher haben Nieren als Probenmaterial für den Nationalen Rückstandskontrollplan eine besondere Bedeutung. Die Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans der letzten Jahre zeigen, dass die meisten Höchstmengenüberschreitungen in dieser Matrix festgestellt werden.

Die für Milch und Honig erarbeitete Methode erlaubt es, dass man zur Messung Proben einsetzen kann, die lediglich mit Puffer verdünnt wurden. Im Vergleich zu Honig besitzen Nieren und Muskelfleisch einen weit höheren Eiweiß- und Fettgehalt. Es ist zu erwarten, dass dies einen Einfluss auf das Testsystem hat, zum Beispiel können Proteine durch unspezifische Bindung an der Sensorchipoberfläche die SPR-Messung stören. Zur Vermeidung von Matrixstörungen sind daher zusätzliche Reinigungsschritte unerlässlich. Daher sollten verschiedene Verfahren zur Probenaufarbeitung untersucht werden. Diese sollten einfach und schnell durchführbar sein, eine gute Wiederfindung und reproduzierbare Werte liefern. Bei der Probenaufarbeitung muss allerdings eine Vielzahl von Faktoren beachtet werden. Der Mechanismus des Testsystems imitiert ein biologisches

System, das nur unter physiologischen Bedingungen abläuft. Daher sollten in injizierten Probelösungen auch physiologische Bedingungen vorliegen. In den vorangegangenen Arbeiten zeigte sich, dass bei der Aufarbeitung der Proben verschiedene Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke und die Verwendung von organischen Lösungsmitteln einen Einfluss auf das Testsystem haben. Da es bei niedrigen pH-Werten zu einer Schädigung der Chipoberfläche kommt, muss eine pH-Wert Kontrolle und unter Umständen eine Korrektur auf pH 7,4 erfolgen. Hohe Ionenstärken führen zu einer unspezifischen Ablösung von TetR und damit zu falschen Ergebnissen. Auch eine Lösungsmittlextraktion, die oft zur Probenaufarbeitung für chromatographische Methoden verwendet wird, sollte vermieden werden. Zum einen stören die organischen Lösungsmittel das empfindliche Gleichgewicht des biologischen Systems, zum anderen zeigen sie mitunter eine schlechte Mischbarkeit mit dem Puffer.

Durch die Kombination aus den Eigenschaften der Analyten und dem biologischem System kann es problematisch sein, Tetracycline aus einer komplexen Matrix wie Niere zu isolieren und Matrixeffekte so zu unterbinden. Insbesondere sollten bei einem Screening-Verfahren falsch-negative Ergebnisse vermieden werden, also alle Rückstände nachgewiesen werden.

Es sollten Untersuchungen zur Stabilität von Analytlösungen und zur Robustheit des Testsystems in Hinblick auf verschiedene Laufpuffer durchgeführt werden.

Der verwendete Bindungspartner TetR (BD) wurde bereits von Andree für ihre Arbeit genutzt und stand durch eine Zusammenarbeit mit der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung [130].

Die Eignung des erarbeiteten Verfahrens zur Aufarbeitung in der Praxis sollte dann mit realen Proben, die vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Verfügung gestellt wurden, überprüft werden. Dabei handelte es sich um amtliche Proben, die mittels LC-MS/MS untersucht wurden. Vor allem sollte überprüft werden, ob es bei dem entwickelten Verfahren zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommt und, ob Rückstände auch unterhalb des MRL zuverlässig nachweisbar sind.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1 Verwendeter Assay

Der Aufbau des verwendeten nicht-kompetitiven Assays zur Bestimmung von Tetracyclinrückständen ist nachfolgend dargestellt.

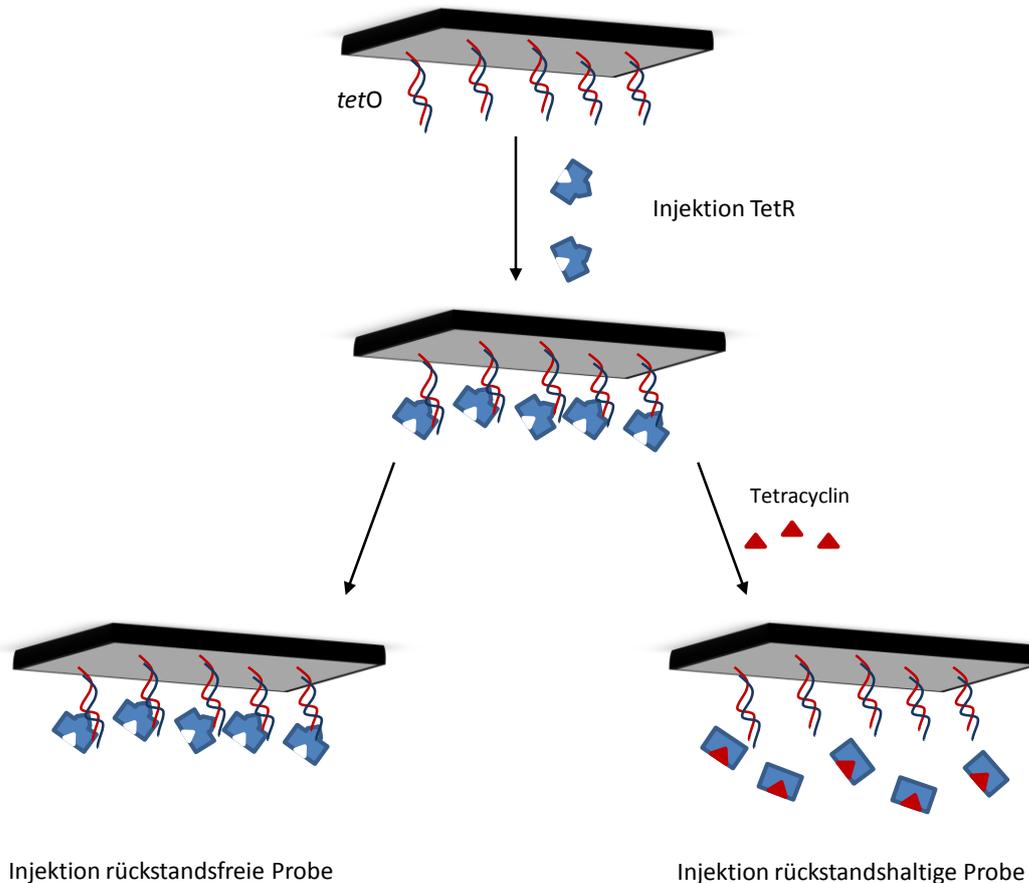


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung des verwendeten Assays nach Möller [127, 129]. Im ersten Schritt wird der Operator (*tetO*) mit dem Repressor (TetR) beladen. Links: Bei der Injektion einer rückstandsfreien Probe bleibt die Bindung zwischen Operator und Repressor bestehen. Es kommt zu keiner Änderung des SPR-Signals. Rechts: Bei der Injektion einer Probe mit Tetracyclinrückständen ändert sich die Konformation des Repressors und es kommt zur Ablösung des Repressors vom Operator. Daraus resultiert ein von der Tetracyclinkonzentration abhängiges negatives Signal.

Bei diesem Assayformat werden Streptavidin (SA)-Sensorchips verwendet. Auf der Chipoberfläche wird mit einer Injektion das biotinylierte DNA-Fragment *tetO* aufgebracht und immobilisiert. Auf Grund der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin muss dies nur einmal erfolgen (Immobilisierung). Im ersten Schritt der Analyse wird *tetO* mit dem Repressorprotein TetR beladen. Im Anschluss erfolgt die Injektion der Probe.

Sind Tetracyclinrückstände in der Probe vorhanden, binden diese an den Repressor. Dieser ändert seine Konformation und es kommt zur Ablösung vom Operator. Daraus resultiert ein negatives SPR-Signal. Bei einer rückstandsfreien Probe wird TetR nicht von dem Operator gelöst und es ist keine Signaländerung zu beobachten. Es ist zu beachten, dass nur die Muttersubstanz reagiert, so dass bei diesem Assay keine Epimere erfasst werden.

In Abbildung 6-2 ist beispielhaft ein Messzyklus dargestellt. In dieser Abbildung sind zwei Sensorgramme übereinander gelegt. In blau ist eine rückstandsfreie und in rot eine tetracyclinhaltige Probe dargestellt. Die Differenz des Signals zwischen den Messpunkten t2 und t3 bei rückstandshaltigen Proben ist mit ΔRU markiert.

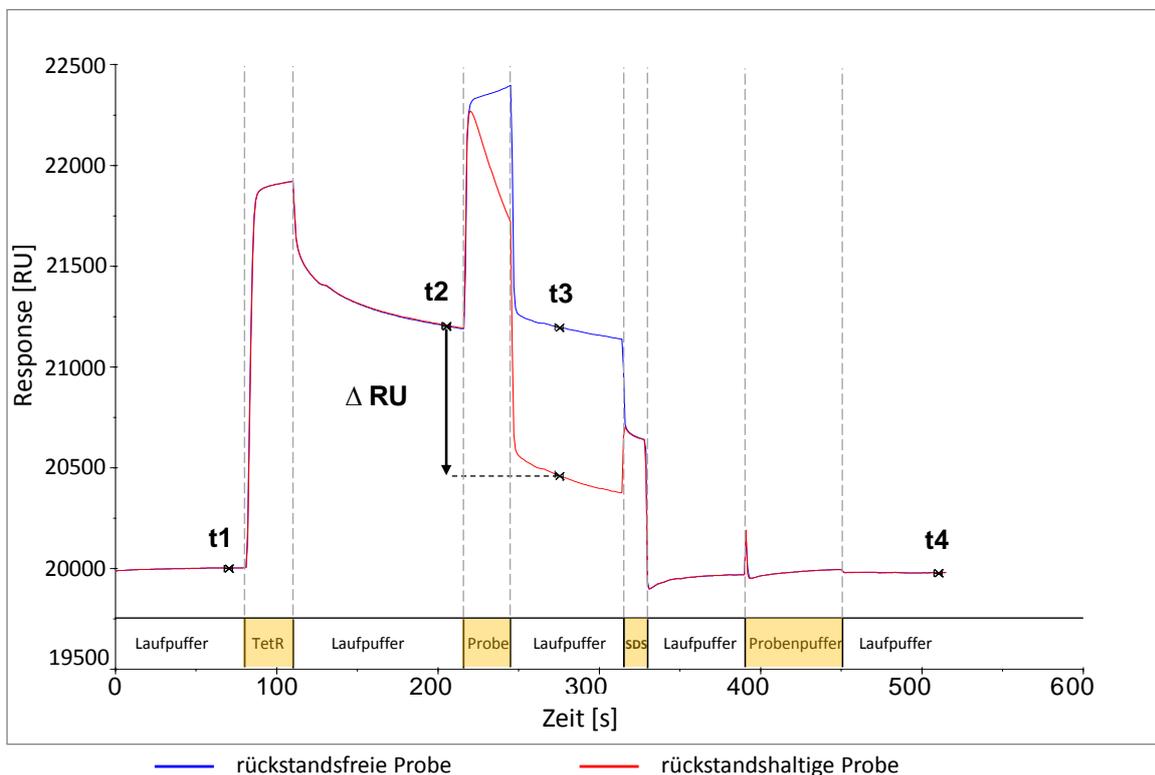


Abbildung 6-2: Beispielsensorgramm mit Report Points t1 bis t4. Dabei sind zwei Sensorgramme übereinander gelegt. In blau ist eine tetracyclinfreie und in rot eine tetracyclinhaltige Probe dargestellt. Die Signaldifferenz aus den Report Points t3 – t2 liefert den von der Tetracyclinkonzentration abhängigen Wert ΔRU .

Im unteren Teil der Abbildung sind die Injektionen der einzelnen Reagenzien markiert. Am Anfang des Zyklus fließt nur Laufpuffer durch das System und das Messsignal ist konstant auf Basislinienniveau. Als erstes wird TetR injiziert und der Operator mit dem Repressor beladen. Es folgt die Injektion der Probe. Ist Tetracyclin in der Probe vorhanden,

kommt es zur Ablösung von TetR, wie im roten Sensorgramm dargestellt. Im nächsten Schritt wird zur Regeneration Natriumdodecylsulfat (SDS) injiziert. Dadurch sollen restliches TetR und Matrixkomponenten von dem Sensorchip gelöst werden. Im letzten Schritt, dem zweiten Regenerationsschritt, wird Probenpuffer injiziert. Wenn nach der letzten Injektion wieder Laufpuffer durch das System fließt, sollte das Signal wieder Basislinienniveau erreicht haben. Der Sensorchip ist jetzt für den nächsten Zyklus bereit.

Möller testete verschiedene Regenerationslösungen für das beschriebene Testsystem [129]. Als bestes Regenerationsreagenz erwies sich SDS. Es war in der Lage die Chipoberfläche vollständig zu regenerieren, ohne die Oberfläche mit dem gebundenen *tetO* anzugreifen. Da SDS sich aber in die Chipoberfläche einlagert, musste ein zweiter Regenerationsschritt erfolgen, um das restliche SDS schneller aus der Dextranmatrix des Sensorchips zu waschen. Als Reagenz für diesen zweiten Regenerationsschritt erwies sich der Probenpuffer als geeignet. Bei dem Probenpuffer handelt es sich um den Laufpuffer mit einem Zusatz von Natriumchlorid (35 mmol/l).

Der sprunghafte Anstieg des Messsignals am Anfang einer Injektion wird als Bulkeffekt bezeichnet. Er resultiert aus den unterschiedlichen Brechungsindices der injizierten Lösung und des Laufpuffers. Erst wenn nach einer Injektion wieder Laufpuffer durch das System fließt, lassen sich Signaländerungen auf Grund von Massenänderungen an der Chipoberfläche erkennen. Zur Kompensation des Bulkeffektes werden für die Auswertung Messpunkte, die sogenannten Report Points, vor und nach den Injektionen der einzelnen Reagenzien definiert. Diese sind in Abbildung 6-2 mit t1 bis t4 bezeichnet.

Tabelle 6-1: Zeitpunkte der Report Points

Report Point	Zeitpunkt
t1 (Basislinie)	10 Sekunden vor der TetR-Injektion
t2 (Response 1)	10 Sekunden vor der Probeninjektion
t3 (Response 2)	30 Sekunden nach der Probeninjektion
t4 (Regeneration)	60 Sekunden nach der Probenpufferinjektion

Der erste Messpunkt wird 10 Sekunden vor der ersten Injektion gesetzt und liefert ein Messsignal für den nur mit *tetO* belegten Chip. Durch die Auftragung des absoluten Responses dieses Messpunktes gegen die Zyklusnummer können Veränderungen an der Chipoberfläche während einer Messreihe beobachtet werden. Steigt das Signal über mehrere Zyklen an, kann dies ein Hinweis auf eine unzureichende Regeneration sein. Ein Abfall des Signals deutet auf eine Schädigung der Chipoberfläche hin. Die Auftragung des Signals am Zeitpunkt t_1 gegen die Zyklusnummer wird im Weiteren als „Basislinie“ bezeichnet.

Der zweite Messpunkt wird 10 Sekunden vor der Probeninjektion gesetzt. Die Signaldifferenz zwischen den Messwerten am Zeitpunkt t_2 und t_1 gibt die Bindung von TetR an die Chipoberfläche an. Signaldifferenzen werden in ΔRU angegeben und als relativer Response bezeichnet. Die Auftragung dieser Signaldifferenz gegen die jeweilige Zyklusnummer gibt einen Überblick über die TetR-Bindung während einer Messreihe und wird im weiteren Verlauf als „TetR-Bindung“ bezeichnet.

Der dritte Report Point wird 30 Sekunden nach der Probeninjektion gesetzt. Die Differenz zwischen den Messpunkten zu den Zeitpunkten t_3 und t_2 wird als relativer Response in ΔRU angegeben und ist in Abbildung 6-2 graphisch hervorgehoben. Da es bei tetracyclinhaltigen Lösungen (Probe oder Standard) zu einer Ablösung des Repressorproteins von *tetO* kommt, ist diese Signaldifferenz in der Regel negativ. Je mehr Tetracyclin in der Lösung vorhanden ist, desto größer ist die Differenz. Auch bei der Injektion von tetracyclinfreien Lösungen (zum Beispiel Probenpuffer) erhält man leicht negative Werte, da es zu einer Dissoziation des TetR-*tetO*-Komplexes und einen kontinuierlichen Abtransport des freigewordenen TetR kommt.

Der letzte Messpunkt wird nach der Regeneration gesetzt. Bei der Regeneration werden noch gebundenes TetR und unspezifisch gebundene Matrixbestandteile von der Sensorchipoberfläche entfernt. Im optimalen Fall sollte das Signal wieder dem Basisliniensignal entsprechen. Der relative Responsewert zwischen t_4 und t_1 gibt daher Auskunft über den Erfolg der Regeneration. Diese Signaldifferenz aufgetragen gegen die Zyklusnummer wird im Weiteren als „Regeneration“ bezeichnet.

6.2 Probenextraktion mit dem Stomacher

In den zuvor durchgeführten Arbeiten lag das Hauptaugenmerk auf den Matrices Milch und Honig [129, 130]. Für eine kommerzielle Nutzung des Tetracyclin-Assays sind aber weitere tierische Matrices von Interesse. Da Nieren hauptsächlich als Ausscheidungsorgane für Tetracycline fungieren, wurde auf diese Matrix besonderes Augenmerk gelegt. Für diese Matrix sollte eine geeignete Aufarbeitung der Proben erarbeitet werden.

Als einfaches und schnelles Verfahren zur Extraktgewinnung, das gute Wiederfindungen und reproduzierbare Werte erwarten ließ, wurde ein Verfahren mit dem Stomacher ausgearbeitet. Der Stomacher ist ein Homogenisator der nach dem „Paddle-Prinzip“ funktioniert. Die vorzerkleinerte Gewebeprobe wird in einen Stomacherbeutel gegeben, mit einem geeigneten Extraktionspuffer versetzt und in den Stomacher eingesetzt. Durch die pulsierende Bewegung der beiden „Paddle“ wird die Probe im Beutel zu einer homogenen Mischung zerrieben.

In Abbildung 6-3 ist schematisch die Aufarbeitung mit dem Stomacher dargestellt. Die genauen Arbeitsanweisungen finden sich in Kapitel 9 Material und Methoden.

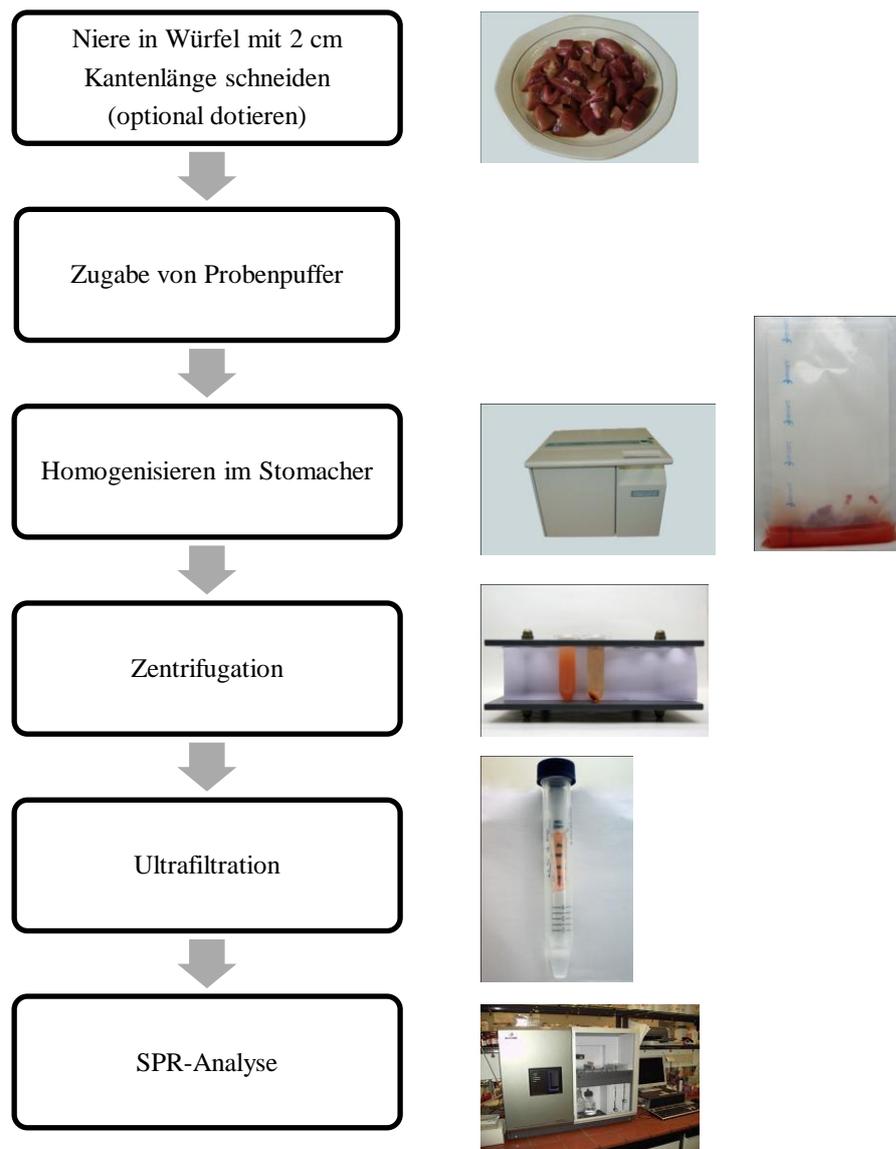


Abbildung 6-3: Schema der Aufarbeitung mit dem Stomacher.

Jede Probe kann zusammen mit dem Probenpuffer direkt in einen neuen Stomacherbeutel eingewogen werden und im Anschluss homogenisiert werden. Dies spart nicht nur Zeit, sondern verhindert auch Verschleppungen bei den einzelnen Proben, da Reinigungsschritte an anderen Geräten zur Homogenisierung, wie Moulinette oder Ultra-Turrax, entfallen. Versuche zu weiteren Probenaufarbeitungen werden in Kapitel 6.3 dargestellt und diskutiert.

Eine Dotierung von Proben kann nach der Zerkleinerung der Niere in Würfel erfolgen. Dazu wurden mit 100 µl einer tetracyclinhaltigen Lösung die Schnittkanten der Nierenwürfel benetzt und die Probe 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurde die dotierte Probe mit dem Probenpuffer in einen Stomacherbeutel eingewogen und weiter aufgearbeitet.

Zur Überprüfung dieser Aufarbeitung wurden fünf Nieren (Schwein) untersucht. Jede Niere wurde undotiert (blank), am halben MRL (300 µg/kg) und am MRL (600 µg/kg) dotiert aufgearbeitet. Alle Proben wurden im Stomacher für 10 Minuten bei 230 upm (Umdrehungen pro Minute) homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation der homogenisierten Probe (25000 g) mit anschließender Ultrafiltration (Millipore Amicon Ultra 4, MWCO 3000 Da, regenerierte Cellulose, 6000 g). Das farblose, klare Filtrat wurde zur SPR-Analyse eingesetzt.

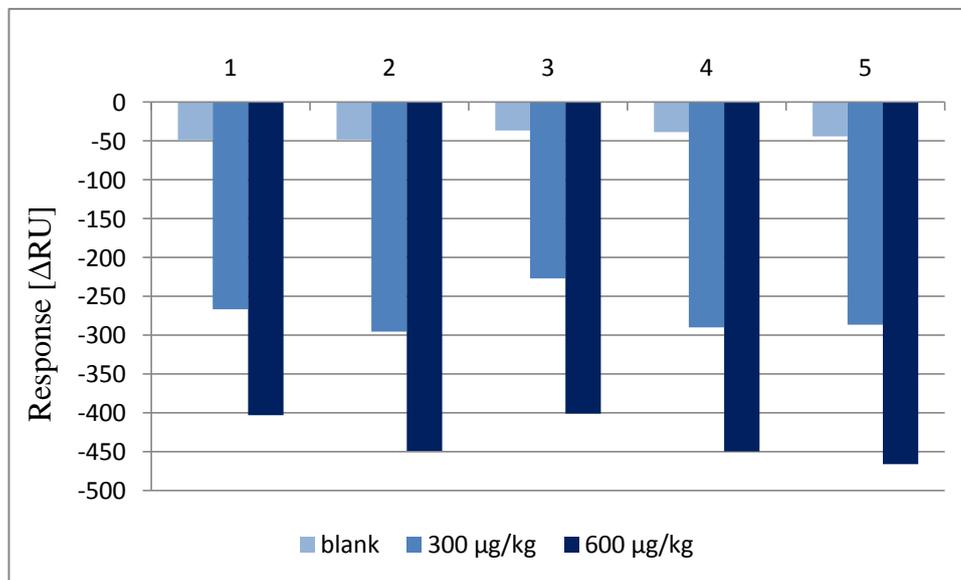


Abbildung 6-4: Vergleich der Δ RU-Werte bei fünf Schweinenierenproben (undotiert, dotiert mit Tetracyclin am halben MRL und am MRL).

In Abbildung 6-4 sind die Ergebnisse der Analyse graphisch dargestellt. Für alle Proben lagen die Δ RU-Werte im deutlich negativen Bereich. Die undotierten Nieren unterschieden sich signifikant von den tetracyclinhaltigen Nieren. Auch eine Unterscheidung zwischen den am MRL und am halben MRL dotierten Proben war möglich. Die Δ RU-Werte für die einzelnen Konzentrationen lagen für die bei 300 µg/kg mit Tetracyclin dotierten Proben

zwischen ΔRU -220 und -290 und für die bei 600 $\mu g/kg$ mit Tetracyclin dotierten Proben zwischen ΔRU -400 und -450. Der Blindwert (blank) erreichte maximal ein ΔRU von -50.

Zur Berechnung der Tetracyclinkonzentration in den Proben und damit zur Wiederfindung wurde eine Kalibrierkurve mit Tetracyclin in Probenpuffer im Konzentrationsbereich 0 – 900 $\mu g/kg$ angesetzt und in derselben Messreihe gemessen.

Tabelle 6-2: Kalibrierung Tetracyclin in Probenpuffer. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Vierfachinjektion.

Konzentration Tetracyclin [$\mu g/kg$]	Messwert [ΔRU]
0	-67
100	-218
300	-421
600	-588
900	-668

In Tabelle 6-3 sind die Werte für die tetracyclinfreien Proben und die Pufferinjektion gegenübergestellt.

Tabelle 6-3: Vergleich Puffer und undotierte Nierenproben, Mittelwerte einer Vierfachinjektion.

Pufferwert [ΔRU]	Niere 1 [ΔRU]	Niere 2 [ΔRU]	Niere 3 [ΔRU]	Niere 4 [ΔRU]	Niere 5 [ΔRU]
-67	-49	-48	-37	-39	-44

Bei der Pufferinjektion wird durch Dissoziation des TetR-*tetO* ein negatives Signal erhalten. Bei den tetracyclinhaltigen Proben werden durch die spezifische Ablösung von TetR wesentlich höhere negativere ΔRU -Werte erhalten. Allerdings können diese durch unspezifische Bindung von Matrixbestandteilen an die Sensorchipoberfläche überlagert werden und so geringer ausfallen. Bei sehr starken unspezifischen Bindungen könnte das Signal sogar positiv werden. Sind keine Matrixinterferenzen vorhanden, sollte das Signal, das durch die tetracyclinfreie Probe erhalten wird, im Bereich des Wertes für die Pufferinjektion liegen. Die Werte der undotierten Proben lagen nur geringfügig oberhalb

der Pufferinjektion, das zeigt, dass infolge der beschriebenen Probenaufarbeitung nur noch vernachlässigbare Matrixinterferenzen auftreten.

Die Messwerte, berechneten Konzentrationen und Wiederfindungen der dotierten Proben sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6-4: Messwerte, berechnete Konzentrationen und Wiederfindungen der 5 mit Tetracyclin am MRL und halben MRL dotierten Schweinenieren. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier Injektionen.

Nierenproben	Messwert [Δ RU]	berechnete Konzentration [μg/kg]	Wiederfindung [%]	
dotiert am halben MRL (300 μg/kg)	1	-266	138	46
	2	-296	162	54
	3	-227	108	36
	4	-287	156	52
	5	-291	156	52
dotiert am MRL (600 μg/kg)	1	-403	270	45
	2	-449	330	55
	3	-401	270	45
	4	-450	330	55
	5	-465	354	59

Die Wiederfindungen der Proben lagen bei beiden Konzentrationen bei circa 50 %. Nur eine Probe wies mit 36 % eine deutlich niedrigere Wiederfindung auf. Für die Wiederfindung von nur ca. 50% kann es mehrere Gründe geben. Möglicherweise wird ein gewisser Anteil des Tetracyclins nicht aus der Probe extrahiert. Eine Versuchsreihe bei der Aufarbeitung mit dem Ultra-Turrax (siehe Kapitel 6.3.2) zeigte, dass es an verschiedenen Stellen der Aufarbeitung zu Verlusten von Tetracyclin kommt, z.B. bei der Ultrafiltration. Bei dieser Versuchsreihe wurden Nierenproben an unterschiedlichen Punkten der Aufarbeitung dotiert und die durch die SPR-Messung erhaltenen Konzentrationen miteinander verglichen. Allerdings wurden bei der Aufarbeitung mit dem Ultra-Turrax

höhere Ausbeuten (zwischen 70 und 100%) erhalten. Im Rahmen dieser Dissertation konnte nicht aufgeklärt werden, warum die auffallende Differenz zwischen Ultra-Turrax und Stomacher auftritt.

Die Messreihe zeigt aber, dass die durchgeführte Probenaufarbeitung mit dem Stomacher für die Aufarbeitung von Nierenproben zum Nachweis von Tetracyclin per SPR grundsätzlich geeignet ist. Matrixstörungen durch Bindung von Matrixkomponenten an die Sensorchipoberfläche konnten durch die beschriebenen Aufarbeitungsschritte beseitigt werden. In weiteren Untersuchungen wurden einzelne Parameter der Aufarbeitung, wie die verwendeten Stomacherbeutel und die Homogenisierungszeit, näher betrachtet und optimiert.

Einfluss des Stomacherbeutels

Beutel für die Homogenisierung im Stomacher gibt es in verschiedenen Ausführungen. Neben den einfachen Beuteln gibt es Stomacherbeutel die zusätzlich einen feinporigen Innenbeutel besitzen, in den die Probe eingefüllt wird. Nach der Homogenisierung verbleiben größere Probenbestandteile im Innenbeutel. Dies erleichtert nach der Homogenisierung die Entnahme von der Probenflüssigkeit aus dem äußeren Beutel.

Es wurde überprüft, ob der Innenbeutel zu Verlusten an Tetracyclin führt, z.B. weil Tetracyclin noch an größeren, im Innenbeutel verbleibenden Probenstücken gebunden ist. Dazu wurden je zwei Nieren (Schwein) am MRL mit Tetracyclin dotiert und aufgearbeitet. Die Homogenisierung erfolgte zum einen in einem Stomacherbeutel ohne Innenbeutel und zum anderen in einem Stomacherbeutel mit Innenbeutel (beide aus Polyethylen).

Tabelle 6-5: Vergleich der Messwerte bei der Aufarbeitung mit und ohne Innenbeutel. Die Schweinenieren wurden mit Tetracyclin am MRL dotiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier Injektionen.

	Aufarbeitung ohne Innenbeutel [Δ RU]	Aufarbeitung mit Innenbeutel [Δ RU]
Niere am MRL dotiert	-327	-349

Die erhaltenen Messwerte lagen bei beiden Aufarbeitungen im gleichen Bereich, wobei der Δ RU-Wert, der mit Innenbeutel erhalten wurde, geringfügig negativer ist. Der Innenbeutel

scheint damit zu keinen Verlusten an Tetracyclin zu führen. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Stomacherbeutel mit Innenbeutel verwendet.

Dauer der Homogenisierung

Zu Anfang der Untersuchungen mit dem Stomacher wurde eine Homogenisierungsdauer von 10 Minuten gewählt. Es wurde überprüft, ob man auch eine kürzere Zeitspanne wählen kann. Dazu wurde eine Messreihe angesetzt, bei der die Schweinenieren vor der Aufarbeitung mit Tetracyclin am MRL (600 µg/kg) dotiert und unterschiedlich lange im Stomacher homogenisiert wurden.

Tabelle 6-6: Ergebnisse der Messreihe mit unterschiedlicher Dauer der Homogenisierung. Die Messung erfolgte auf einem Sensorchip mit einem Immobilisierungslevel von 938 RU. Es wurden zwei Schweinenieren (Nierenprobe 1 und 2) untersucht. Die Dotierung der Nierenproben erfolgte mit Tetracyclin (TC) am MRL. Messwerte sind Mittelwerte aus einer Vierfachinjektion.

Kalibrierung		Nierenprobe dotiert mit TC am MRL	Zeit der Homogenisierung [min]	Messwert [Δ RU]
Konzentration TC [µg/kg]	Messwert [Δ RU]			
0	-31	1	1	-343
100	-163	2	1	-347
300	-321	1	2	-344
600	-455	2	2	-330
900	-531	1	5	-312
		2	5	-326
		1	8	-324
		2	8	-288

Alle Proben, außer der zweiten 8 Minuten Homogenisierung, führten zu vergleichbaren Messwerten mit einer Wiederfindung von ca. 50 %.

Tabelle 6-7: Prozentuale Wiederfindung bei der Messreihe mit unterschiedlicher Dauer der Homogenisierung. Die Nierenproben wurden mit Tetracyclin am MRL dotiert.

Zeit [min]	Wiederfindung [%]		
	Nierenprobe 1	Nierenprobe 2	Mittelwert
1	56	58	57
2	56	52	54
5	47	51	49
8	51	41	46

Bei einer Homogenisierungsdauer von einer Minute konnte im Stomacherbeutel keine homogene Masse erzeugt werden. Es waren noch viele größere Nierenstücke zu erkennen. Im Hinblick auf spätere Untersuchungen mit gewachsenem Material wurde die Dauer der Homogenisierung auf 2 Minuten gesetzt.

Die erarbeitete Probenaufarbeitung mit dem Stomacher ist dazu geeignet, Nierenproben so vorzubereiten, dass Tetracyclinrückstände mittels SPR nachgewiesen werden können. Matrixinterferenzen konnten durch die Aufarbeitung der Proben beseitigt werden. Auch Nieren, die am halben MRL dotiert waren, ließen sich von rückstandsfreien Proben eindeutig unterscheiden. Zusätzlich wurde die Homogenisierungsdauer der Proben verkürzt.

6.2.1 Nachweis verschiedener Tetracycline

Der Assay soll nicht nur zum Nachweis von Tetracyclin eingesetzt werden, sondern zum Screening der gesamten Antibiotikaklasse. Die Probenaufarbeitung sollte daher für alle Tetracycline geeignet sein, die in der Europäischen Union für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen sind.

Es wurden zwei Schweinenieren in Würfel mit ca. 2 cm Kantenlänge geschnitten und gemischt. Anschließend wurden daraus insgesamt 8 Schweinenierenproben gebildet. Der Mix aus zwei Nieren diente dazu, „Einzeleffekte“ der zwei Nieren möglichst zu vermeiden. Die individuellen Unterschiede einzelner Nieren sollten erst in späteren Versuchsreihen untersucht werden. Die 8 Proben wurden mit den vier zugelassenen Tetracyclinen Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin, jeweils am MRL und am halben MRL am Anfang der Aufarbeitung dotiert und aufgearbeitet.

Zusätzlich wurden zwei undotierte Proben (blank) mit aufgearbeitet. Die Probenaufarbeitung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Für die spätere Berechnung der Konzentrationen wurden Kalibrierkurven mit Tetracyclin und Chlortetracyclin in Probenpuffer im Konzentrationsbereich von 0 – 900 µg/kg gemessen.

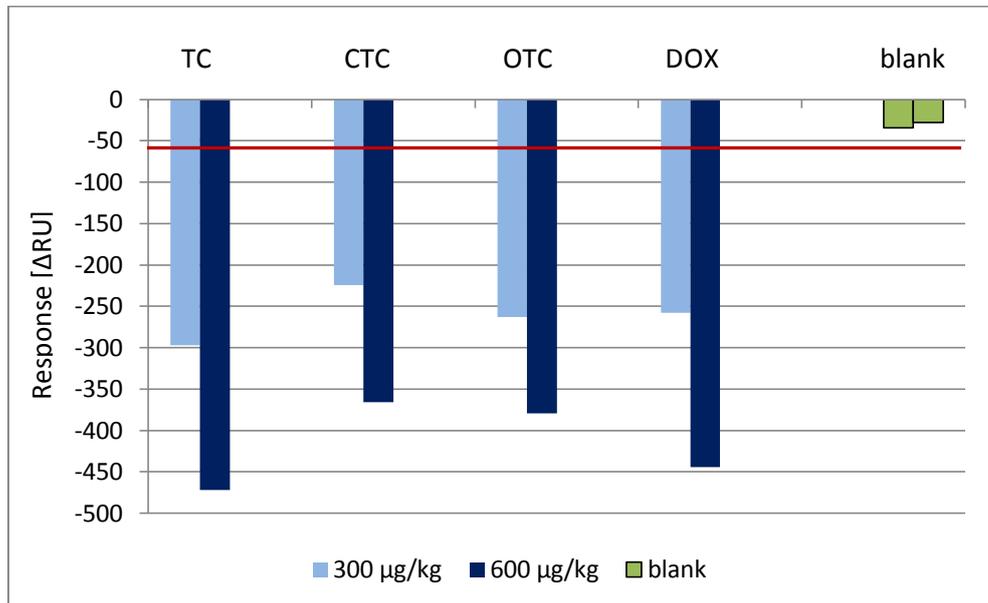


Abbildung 6-5: Vergleich der vier Tetracycline Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin (CTC), Oxytetracyclin (OTC) und Doxycyclin (DOX). Die aus zwei unterschiedlichen Nieren gemischten Proben wurden jeweils am MRL und am halben MRL dotiert. Zum Vergleich wurden zwei undotierte Proben (blank) mit untersucht. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier Injektionen. In rot ist der erhaltene Pufferwert aus der Kalibrierung eingezeichnet. Der Pufferwert lag bei -60 RU.

In Abbildung 6-5 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Alle vier Tetracycline konnten nach der Probenaufarbeitung mit dem Assay nachgewiesen werden. Die Δ RU-Werte der undotierten Proben lagen mit -34 RU und -28 RU über den Werten des Probenpuffers mit -60 RU. Der Wert des Probenpuffers entspricht dem Nullwert der Kalibrierung. Bei den undotierten Proben kommt es also zu keiner Ablösung von TetR. Die undotierten Nieren konnten damit anhand des Testsystems als rückstandsfrei bewertet werden. Die dotierten Proben, sowohl die am MRL, als auch die am halben MRL, unterschieden sich signifikant von den undotierten Proben. Mit der Probenaufarbeitung war es möglich alle vier Tetracycline in Schweinenieren am MRL und halben MRL mittels SPR nachzuweisen.

Tabelle 6-8: Vergleich der Δ RU-Werte der vier Tetracycline bei 300 und 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier Injektionen.

Dotierte Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Tetracyclin Messwert [ΔRU]	Chlortetracyclin Messwert [ΔRU]	Oxytetracyclin Messwert [ΔRU]	Doxycyclin Messwert [ΔRU]
300	-297	-224	-263	-259
600	-472	-366	-379	-444

Die Messwerte für die dotierten Nieren sind in Tabelle 6-8 zusammengefasst. Für die vier Tetracycline wurden bei den gleichen Konzentrationen unterschiedliche Δ RU-Werte erhalten. Tetracyclin lieferte bei den dotierten Proben die höchsten und Chlortetracyclin die niedrigsten Signale.

Die beiden Kalibrierkurven mit Tetracyclin und Chlortetracyclin zeigten für gleiche Konzentrationen unterschiedliche Signale. Die Messwerte sind in Tabelle 6-9 dargestellt.

Tabelle 6-9: Vergleich der Δ RU-Werte der beiden Kalibrierungen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier Injektionen.

Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Tetracyclinkalibrierung Messwert [Δ RU]	Chlortetracyclinkalibrierung Messwert [Δ RU]
0	-62	-57
100	-235	-279
300	-470	-596
600	-675	-889
900	-833	-1017

Anders als bei den dotierten Proben, führt Chlortetracyclin in der Pufferlösung zu einer höheren TetR-Ablösung, als Tetracyclin, wie schon von Möller beobachtet. Möller untersuchte die Kreuzreaktivität der Tetracycline. Dabei kam heraus, dass Chlortetracyclin im Vergleich zu Tetracyclin mehr TetR von *tetO* ablöst [129].

Dieses unterschiedliche Ansprechverhalten gilt nicht nur für Tetracyclin und Chlortetracyclin, sondern auch für Oxytetracyclin und Doxycyclin. Um zu sehen, wie groß der Einfluss des einzelnen Tetracyclins auf das Testsystem und damit auch der Einfluss auf die quantitative Auswertung ist, wurden in einer weiteren Messreihe für alle vier Tetracycline Kalibrierkurven im Bereich von 0 – 900 µg/kg in Probenpuffer aufgenommen. Das Ergebnis ist graphisch in Abbildung 6-6 dargestellt.

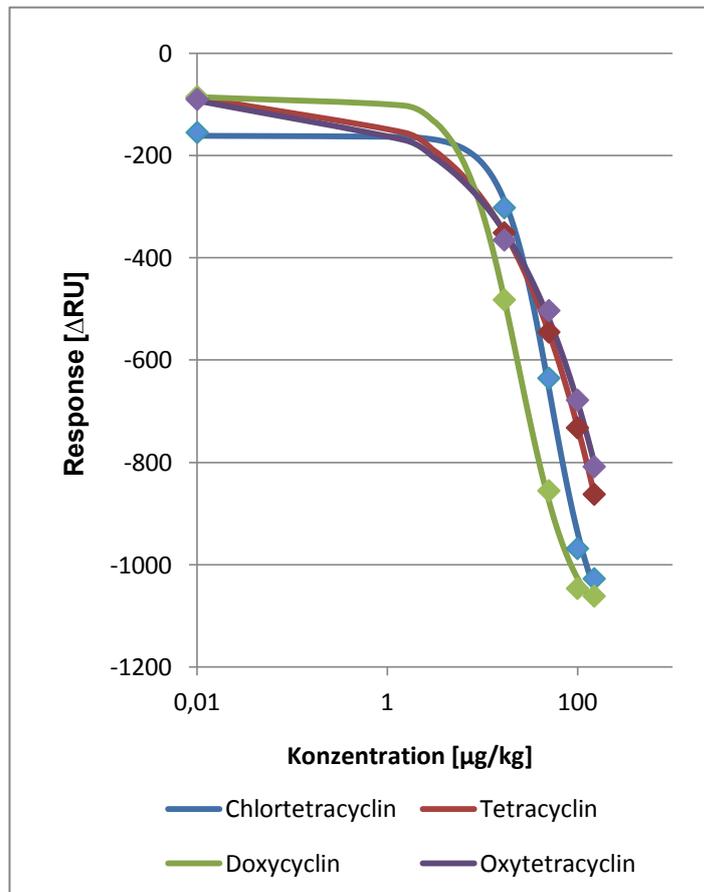


Abbildung 6-6: Vergleich der Kalibrierkurven verschiedener Tetracycline in Probenpuffer. Mittelwerte von Vierfachinjektionen.

Alle vier Tetracycline zeigten eine unterschiedliche Ablösung von TetR, die sich auch auf die Berechnung der Konzentrationen auswirkt. Die geringste Ablösung zeigte Oxytetracyclin, die höchste Doxycyclin.

Dieses unterschiedliche Ansprechverhalten der einzelnen Tetracycline wirkt sich unmittelbar auf eine quantitative Auswertung aus. Je nachdem welche Kalibrierung für die Berechnung herangezogen wird, erhält man unterschiedliche Ergebnisse. Eine ausführliche

Diskussion des unterschiedlichen Ansprechverhaltens von Chlortetracyclin in Puffer und in den dotierten Proben findet sich in Kapitel 6.2.2.

Die Auswirkung auf die Berechnung der Konzentration ist in Tabelle 6-10 für die Schweinenieren aus Tabelle 6-8 dargestellt.

Tabelle 6-10: Vergleich der berechneten Konzentrationen und Ausbeuten mit den beiden Kalibrierkurven aus Tabelle 6-9 (TC = Tetracyclin, CTC = Chlortetracyclin, OTC = Oxytetracyclin, DOX = Doxycyclin).

Schweinenieren dotiert	Konzentration [µg/kg]		Konzentration [µg/kg]	
	berechnet mit TC- Kalibrierung	Ausbeute [%]	berechnet mit CTC- Kalibrierung	Ausbeute [%]
TC 300 µg/kg	144	48	114	38
CTC 300 µg/kg	90	30	78	26
OTC 300 µg/kg	120	40	96	32
DOX 300 µg/kg	114	38	96	32
TC 600 µg/kg	312	52	210	35
CTC 600 µg/kg	204	34	150	25
OTC 600 µg/kg	216	36	156	26
DOX 600 µg/kg	276	46	192	32

Die berechneten Konzentrationen aller Proben lagen auf Grund der höheren TetR-Ablösung des Chlortetracyclins bei dieser Kalibrierung niedriger als bei der Berechnung mit der Tetracyclinkalibrierung. Bei den berechneten Konzentrationen und Ausbeuten ergaben sich dadurch nennenswerte Unterschiede.

Diskussion der Ergebnisse

Der verwendete Biosensorassay ist, wie von Möller dargelegt, nicht in der Lage zwischen den einzelnen Tetracyclinen zu unterscheiden und eignet sich daher nur als Screeningverfahren für die gesamte Antibiotikagruppe [129]. In realen Proben ist aber zumeist nicht bekannt, welches Tetracyclin verwendet wurde. Ohne Vorkenntnis, welches

Tetracyclin in der Probe als Rückstand enthalten ist, ist eine Berechnung der Konzentration nicht möglich. Allerdings konnte mit den durchgeführten Messungen auch gezeigt werden, dass es mit der erarbeiteten Probenaufarbeitung möglich ist, in der Matrix Schweineniere, jedes der vier Tetracycline nachzuweisen. Der Nachweis war für alle bei lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Tetracyclinen auch noch am halben MRL ohne Probleme möglich.

6.2.2 Nachweis Chlortetracyclin

Die im vorigen Kapitel dargestellten Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick widersprüchlich zu sein. Während bei der Kalibrierung Chlortetracyclin die höchste TetR-Ablösung verursacht, zeigten die mit Chlortetracyclin dotierten Nierenproben die am wenigsten negativen Δ RU-Werte. Ursache dafür sind Abbau- und Umlagerungsreaktionen (Kapitel 2.2), die während der gesamten Probenaufarbeitung an den Molekülen der Tetracycline stattfinden und vor allem bei Chlortetracyclin beobachtet werden.

Wie schnell diese Reaktionen bei Raumtemperatur für Chlortetracyclin ablaufen, ließ sich in den einzelnen Messreihen beobachten. Jede Probe und jede Kalibrierlösung wurde pro Messreihe mehrfach gemessen. Während bei den anderen Tetracyclinen die Δ RU-Werte um einen bestimmten Wert schwankten, ließ sich bei Chlortetracyclin ein klarer Trend erkennen. Bei jedem Zyklus wurde ein geringerer Absolutwert von Δ RU erhalten. In dieser Zeit werden Umlagerungs- und Abbauprodukte gebildet, die von dem Biosensorassay nicht erfasst werden. Daher werden für die mit Chlortetracyclin dotierten Proben die niedrigsten Ergebnisse erhalten.

Beispielhaft sind in Tabelle 6-11 die einzelnen Werte der Vierfachbestimmung der mit Chlortetracyclin dotierten Nieren aus der zuvor beschriebenen Messreihe aufgeführt (Kapitel 6.2.1). In Abbildung 6-7 ist der Trend nochmals graphisch dargestellt.

Tabelle 6-11: Abnahme der Signale während einer Messreihe bei mit Chlortetracyclin dotierten Nierenproben (Schwein).

Konzentration Chlortetracyclin [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Zyklusnummer	Messwert [ΔRU]
300	12	-238
	32	-222
	52	-226
	72	-209
600	13	-398
	33	-370
	53	-350
	73	-345

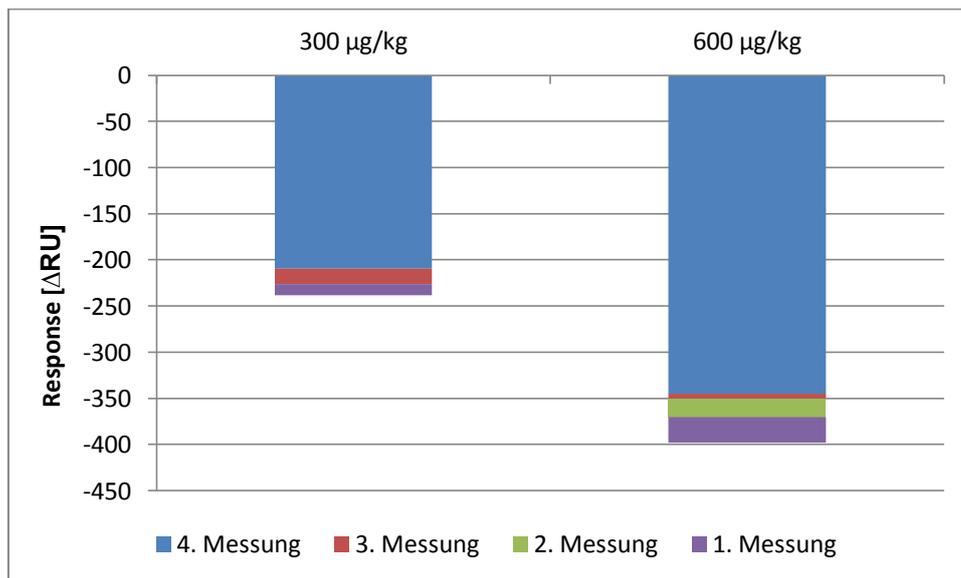


Abbildung 6-7: Abnahme der ΔRU -Werte der mit Chlortetracyclin dotierten Nierenproben (Schwein) bei den einzelnen Zyklen.

Nicht nur bei den dotierten Proben war der Trend zu verringerten ΔRU -Werten nach mehreren Messzyklen zu erkennen, sondern auch bei den Messungen der Chlortetracyclin-Kalibrierlösungen. Zum Vergleich wurde eine Kalibrierung von Chlortetracyclin im

Bereich von 100 und 900 µg/kg gemessen. Dabei wurde jede Kalibrierlösung fünfmal gemessen. Die ersten beiden Messungen erfolgten direkt hintereinander, zwischen den restlichen Messungen lagen jeweils 20 Zyklen. Ein Messzyklus dauert ca. 15 Minuten, so dass zwischen den einzelnen Zyklen ca. 5 Stunden lagen.

Tabelle 6-12: Abnahme der Δ RU-Werte von Chlortetracyclin während der Kalibrierung.

Konzentration Chlortetracyclin [µg/kg]	Zyklusnummer	Messwert [Δ RU]
100	8	-332
	9	-335
	32	-299
	52	-280
	72	-267
300	10	-681
	11	-679
	33	-632
	53	-608
	73	-575
600	12	-994
	13	-992
	34	-970
	54	-960
	74	-923
900	14	-1043
	15	-1044
	35	-1031
	55	-1018
	75	-1000

Anhand der in Tabelle 6-12 aufgeführten Werte lässt sich die Abnahme der Δ RU-Werte gut erkennen. Während zwischen den ersten beiden Zyklen, die direkt hintereinander gemessen wurden, kaum eine Abnahme der Werte beobachtet wurde, liegen zwischen der

ersten und letzten Messung bis zu 100 RU. Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse in Abbildung 6-8 nochmals graphisch dargestellt.

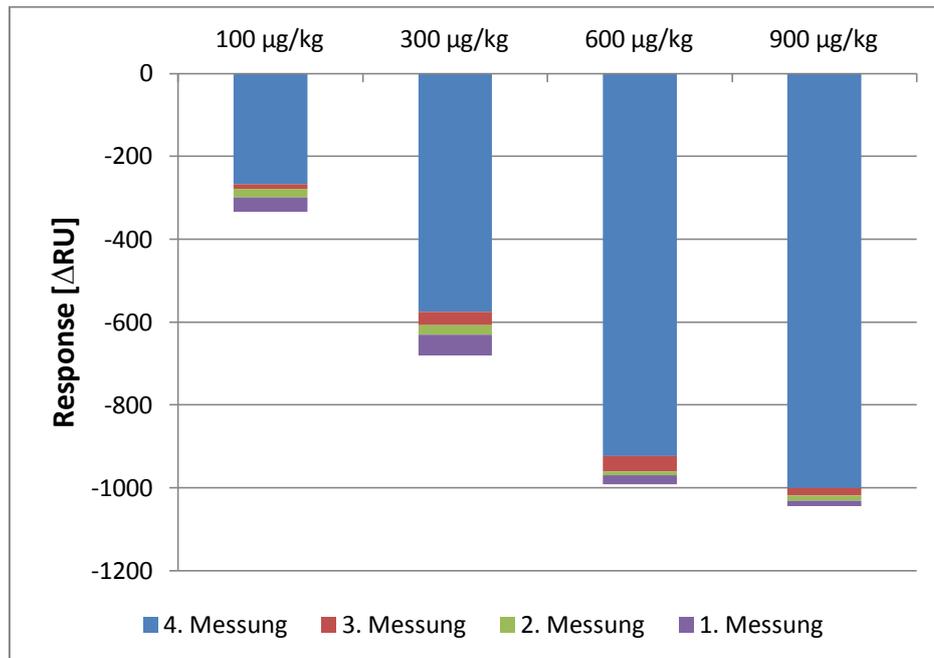


Abbildung 6-8: Abnahme der Δ RU-Werte von Chlortetracyclin bei der Kalibrierung.

Bei keinem der anderen drei untersuchten Tetracycline wurde dieser Trend zu weniger stark negativen Messwerten beobachtet. Der Abbau von Chlortetracyclin bei den dotierten Proben erstreckt sich über die gesamte Probenaufarbeitung, und führt zu den geringen Wiederfindungen bei den mit Chlortetracyclin dotierten Proben.

Daher stellt Chlortetracyclin eine besondere Herausforderung für die Probenaufarbeitung und das Screening mit dem Biosensorassay dar. Für die weiteren Untersuchungen wurde mit Chlortetracyclin gearbeitet. Wenn es mit der Probenaufarbeitung möglich ist, Chlortetracyclin trotz der zuvor aufgeführten Schwierigkeiten nachzuweisen, sollte der Nachweis für Tetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin ohne Probleme durchführbar sein.

Für die weiteren Untersuchungen wurde daher mit Chlortetracyclin gearbeitet. Dazu wurden zwanzig Schweinenieren mit Chlortetracyclin am MRL dotiert und analysiert. Die Dotierung erfolgte nach der beschriebenen Aufarbeitung. Mit Hilfe einer in Probenpuffer angesetzten Kalibrierung im Bereich 0 – 900 µg/kg wurden die Konzentrationen und die durchschnittliche Wiederfindung der Proben berechnet. Zusätzlich wurden zwei der zwanzig Nieren undotiert aufgearbeitet und gemessen („blank“). Die Messwerte sind in Abbildung 6-9 graphisch dargestellt. Die Kalibrierung und berechneten Konzentrationen und Wiederfindungen sind in Tabelle 6-13 zusammengefasst.

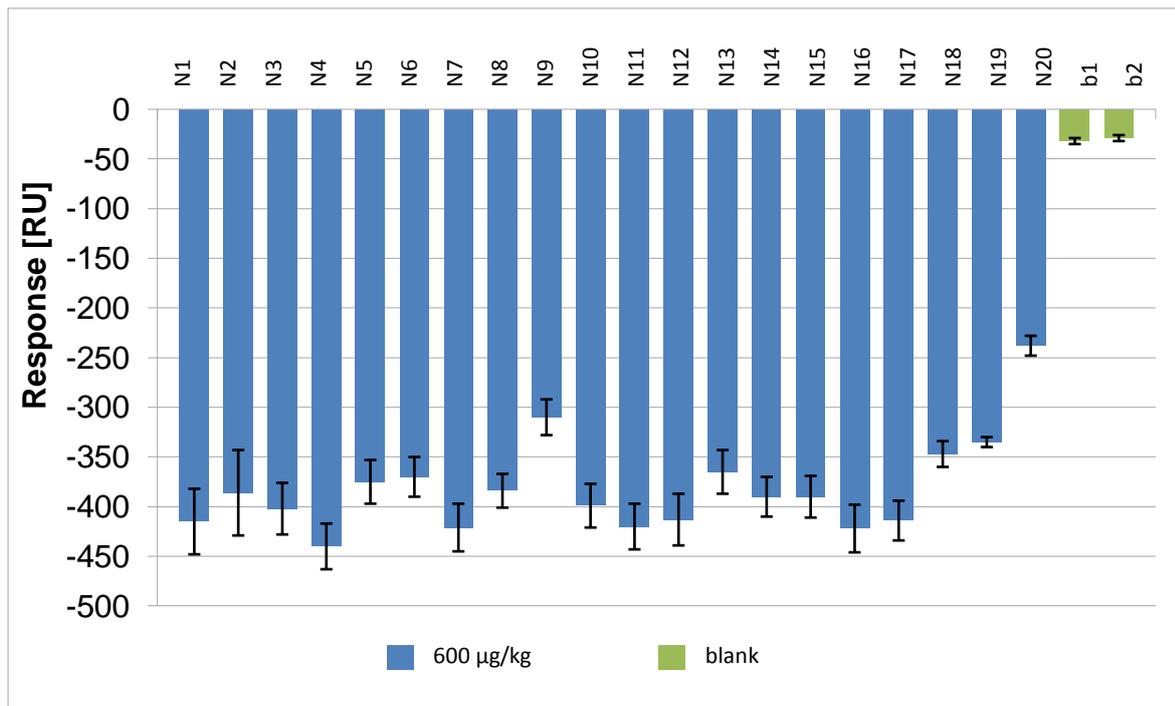


Abbildung 6-9: Ergebnis der am MRL mit Chlortetracyclin dotierten Schweinenieren (mit N = am MRL dotierte Niere, b = „blank“). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion.

Tabelle 6-13: Messwerte, Konzentrationen und Wiederfindungen der zwanzig mit Chlortetracyclin am MRL dotierten Schweinenieren und der zwei undotierten Proben (blank). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion.

Kalibrierung		Probe	Messwert [Δ RU]	Konzentration CTC [μ g/kg]	Wiederfindung [%]
Konzentration CTC [μ g/kg]	Messwert [Δ RU]				
0	-34	blank 1	-32		
100	-304	blank 2	-29		
300	-644	1	-415	148	25
450	-796	2	-386	135	23
600	-878	3	-402	142	24
750	-909	4	-440	160	27
900	-932	5	-375	130	22
		6	-370	128	21
		7	-421	151	25
		8	-384	134	22
		9	-310	104	17
		10	-399	141	24
		11	-420	150	25
		12	-413	147	25
		13	-365	126	21
		14	-390	137	23
		15	-390	137	23
		16	-422	151	25
		17	-414	148	25
		18	-347	119	20
		19	-335	114	19
		20	-238	78	13

Anhand der Abbildung und der Tabelle ist gut zu erkennen, dass bei allen zwanzig Proben eine eindeutige Unterscheidung zu den undotierten Proben möglich ist. Die Δ RU-Werte für

die undotierten Proben lagen knapp oberhalb des Pufferwertes und konnten damit als rückstandsfrei beurteilt werden.

Die berechneten Konzentrationen lagen bis auf Probe zwanzig zwischen 114 und 151 µg/kg. Bei Probe zwanzig lag der Wert mit 78 µg/kg niedriger. Die Wiederfindungen lagen mit Ausnahme von Niere zwanzig zwischen 17 und 27 %. Daraus ergibt sich eine mittlere Wiederfindung von 22 %. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher zur Abschätzung der Konzentration von einer 22 %igen Wiederfindung ausgegangen.

Für die niedrige Wiederfindung von nur 22 % kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen ist es denkbar, dass ein gewisser Anteil des Chlortetracyclins nicht aus den Proben extrahiert wird. Auch bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten wird es Verluste geben. So konnte in einer Versuchsreihe gezeigt werden, dass es bei der Ultrafiltration Verluste gibt (siehe Kapitel 6.3.2). Bei Chlortetracyclin kommt hinzu, dass es das empfindlichste der vier untersuchten Tetracycline ist. So ist während der Probenaufarbeitung von chemischen Veränderungen am Chlortetracyclinmolekül, wie z.B. der Bildung von Epimeren, auszugehen. Epimere werden aber von dem verwendeten Assay nicht erfasst.

6.2.3 Nieren unterschiedlicher Tierarten

In den zuvor durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach der angewandten Probenaufarbeitung ein Screening aller vier Tetracycline in Schweinenieren möglich ist. Da Tetracycline hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden werden, haben sie als Probenmaterial für den Nationalen Rückstandskontrollplan eine besondere Bedeutung. Daher wurden die Untersuchungen ausgedehnt auf Nieren von Kalb, Rind und Lamm. Die Dotierung und Aufarbeitung der Proben erfolgte analog zu den Schweinenieren. Von jeder Tierart wurden je fünf Nieren untersucht. Die Dotierung am MRL erfolgte mit Chlortetracyclin. Zusätzlich wurde von jeder Tierart zusätzlich eine der fünf Nieren ohne Dotierung („blank“) aufgearbeitet und gemessen. Anhand der undotierten Proben kann im Vergleich zum Pufferwert eine Aussage über mögliche Matrixinterferenzen getroffen werden. Danach sollte geprüft werden, ob eine signifikante Unterscheidung zwischen rückstandsfreien und rückstandshaltigen Proben möglich ist.

Für die Auswertung wurde eine Kalibrierkurve mit Chlortetracyclin im Konzentrationsbereich 0 – 900 µg/kg in Probenpuffer angesetzt und gemessen.

In Tabelle 6-14 sind die Messwerte der Kalibrierung und der Proben tabellarisch aufgeführt. In Abbildung 6-10 ist das Ergebnis dieser Messreihe graphisch dargestellt.

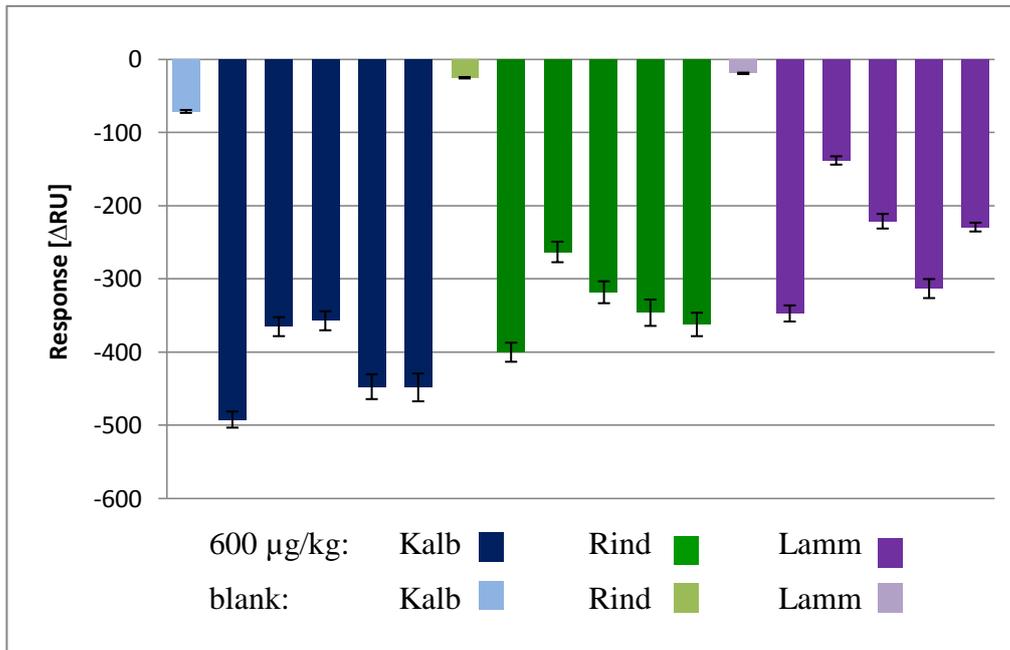


Abbildung 6-10: Δ RU-Werte für die verschiedenen Matrices bei Dotierung mit Chlortetracyclin am MRL-Wert. Die Fehlerbalken stellen die Streubreite einer Dreifachinjektion dar.

Bei allen Tierarten war eine Unterscheidung zwischen rückstandshaltigen und rückstandsfreien Proben möglich. Die Lammnieren zeigten bei den gemessenen Δ RU-Werten die größten Streuungen.

Tabelle 6-14: Messwerte und berechnete Konzentrationen der mit Chlortetracyclin (CTC) dotierten (600µg/kg) Proben. Bei der Berechnung der Konzentration wurde als Korrekturfaktor die Wiederfindung von 22 % berücksichtigt.

Kalibrierung		Probe	Konzentration	
Konzentration CTC [µg/kg]	Messwert [ΔRU]		Messwert	mit Korrekturfaktor [µg/kg]
0	-43	Kalb blank	-71	-
100	-314	Kalb 1	-492	868
300	-608	Kalb 2	-365	559
450	-724	Kalb 3	-357	545
600	-782	Kalb 4	-447	745
750	-805	Kalb 5	-448	745
900	-815	Rind blank	-25	-
		Rind 1	-400	636
		Rind 2	-263	372
		Rind 3	-318	468
		Rind 4	-346	523
		Rind 5	-362	550
		Lamm blank	-19	-
		Lamm 1	-347	523
		Lamm 2	-138	172
		Lamm 3	-221	305
		Lamm 4	-313	459
		Lamm 5	-229	315

Die Signale der undotierten Rind- und Lammprouben lagen oberhalb des Pufferwertes und konnten damit als rückstandsfrei beurteilt werden. Der Wert der undotierten Lammnieren liegt dabei am höchsten und deutet auf unspezifische Bindungen von Matrixbestandteilen an die Sensorchipoberfläche hin. Auch die stark streuenden Messwerte von -138 RU bis -347 RU der dotierten Lammnieren legen den Schluss nahe, dass es bei dieser Matrix zu Störungen im Testsystem kommt. Für genauere Aussagen müsste eine größere Anzahl an Lammnieren untersucht werden.

Die stärkste Abnahme der RU-Werte wurde für die Kalbsnieren erhalten. Das Signal der undotierten Kalbsniere liegt bereits im Bereich der Kalibriergeraden und würde eine sehr geringe Tetracyclinbelastung anzeigen (falsch-positiv). Trotzdem ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen den dotierten und undotierten Proben möglich.

Zum Vergleich wurden für die verschiedenen Tierarten die Wiederfindungen für Chlortetracyclin berechnet. Die Ergebnisse der Wiederfindungen aller untersuchten Tierarten sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6-15: Wiederfindungen bei den einzelnen Matrices. Die Dotierung erfolgte mit Chlortetracyclin am MRL.

	Kalb	Rind	Lamm	Schwein	Mittelwert
Wiederfindung [%]	25	19	13	22	20

Die Wiederfindung für Chlortetracyclin in Lammnieren lag mit 13 % deutlich niedriger als bei den anderen untersuchten Tierarten.

Bei allen Nieren unterschieden sich die am MRL dotierten Proben signifikant von den undotierten Proben. Chlortetracyclin konnte in allen vier untersuchten Tierarten nachgewiesen werden. Damit konnten die Untersuchungen zu den unterschiedlichen Tierarten erfolgreich abgeschlossen werden.

6.2.4 Verdeckte Kontrollanalyse

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde eine verdeckte Kontrollanalyse mit Chlortetracyclin durchgeführt. Dazu wurden 20 Schweinenieren von einer anderen Person bereit gestellt und erst nach erfolgter Analyse und Auswertung der Ergebnisse, die Konzentrationen in den einzelnen Proben bekannt gegeben. Die Proben waren entweder nicht dotiert, am MRL (600 µg/kg) oder am halben MRL (300 µg/kg) dotiert. Jede Probe wurde dreimal injiziert.

Zusätzlich wurde eine Kalibriergerade mit Chlortetracyclin in Probenpuffer aufgenommen. Folgende Konzentrationen wurden angesetzt: 0, 100 µg/kg, 300 µg/kg (halber MRL), 450 µg/kg, 600 µg/kg (MRL), 750 µg/kg und 900 µg/kg (anderthalbfacher MRL).

Die Messwerte der Kalibrierung und der Proben sind in Tabelle 6-16 zusammengefasst. In Abbildung 6-11 ist das Ergebnis der verdeckten Kontrollanalyse graphisch dargestellt.

Tabelle 6-16: Δ RU-Werte der Kalibrierung und der Schweinenieren. Die Nierenproben wurden mit Chlortetracyclin (CTC) dotiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion.

Kalibrierung		Schweinenieren- probe	Messwert [ΔRU]
Konzentration CTC [μg/kg]	Messwert [ΔRU]		
0	-44	1	-29
100	-318	2	-243
300	-606	3	-397
450	-723	4	-240
600	-776	5	-324
750	-797	6	-209
900	-809	7	-297
		8	-192
		9	-22
		10	-223
		11	-325
		12	-255
		13	-320
		14	-239
		15	-21
		16	-21
		17	-339
		18	-23
		19	-362
		20	-21

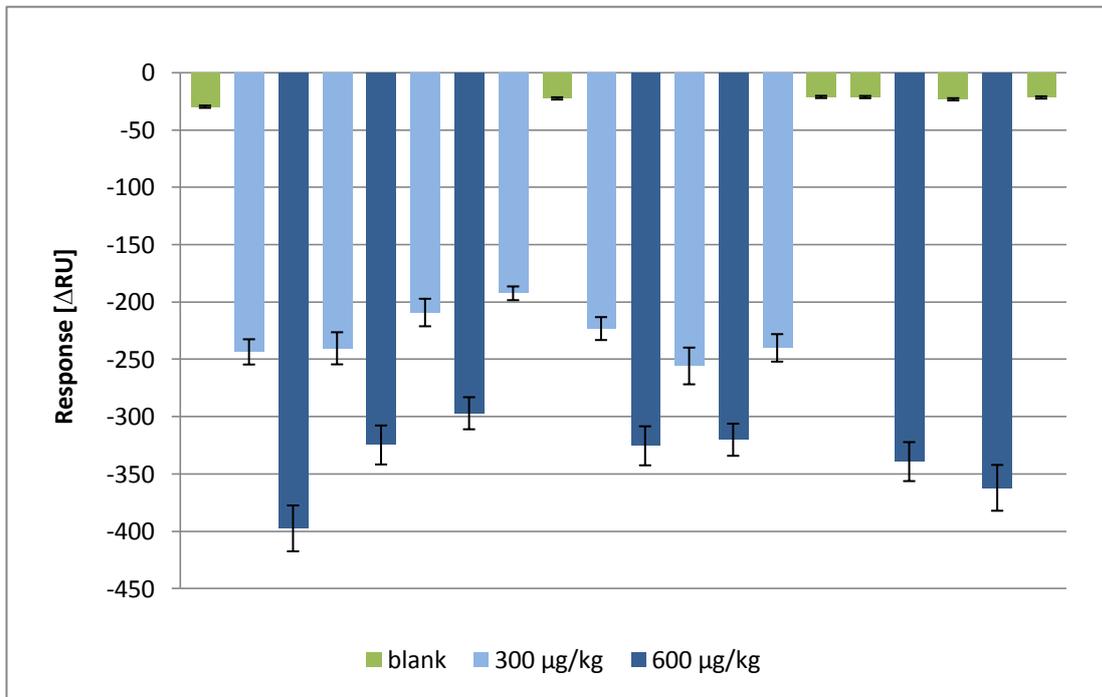


Abbildung 6-11: Ergebnis der verdeckten Kontrollanalyse der Schweinenieren. Die Dotierung erfolgte mit Chlortetracyclin. Die Fehlerbalken stellen die Streubreite einer Dreifachinjektion dar.

Die ΔRU -Werte der Proben, die oberhalb des Pufferwertes lagen, wurden als rückstandsfrei beurteilt. Auch anhand der Abbildung ist eine gute Unterscheidung zwischen rückstandsfreien Proben und dotierten Proben (MRL und halben MRL) zu erkennen. Auch die am halben MRL dotierten Proben unterschieden sich signifikant von den rückstandsfreien Proben.

Mittels der Kalibrierung wurden die Konzentrationen der Proben abgeschätzt. Da bei den zuvor durchgeführten Versuchen für Chlortetracyclin in Schweinenieren eine Wiederfindung von 22 % ermittelt wurde, wurden die Konzentrationen unter Einbeziehung dieser Wiederfindung berechnet.

Tabelle 6-17: Ergebnisse der verdeckten Kontrollanalyse unter Einbeziehung einer 22%igen Wiederfindung. Die Dotierung erfolgte mit Chlortetracyclin. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion. Mit n.n. = nicht nachweisbar.

Probe	dotierte Konzentration [µg/kg]	abgeschätzte Konzentration [µg/kg]	Ausbeute mit Wiederfindungs- Korrektur [%]
1	0	n.n.	n.n.
2	300	333	111
3	600	623	104
4	300	328	109
5	600	473	79
6	300	279	93
7	600	423	71
8	300	253	84
9	0	n.n.	n.n.
10	300	300	100
11	600	473	79
12	300	353	118
13	600	464	77
14	300	327	109
15	0	n.n.	n.n.
16	0	n.n.	n.n.
17	600	500	83
18	0	n.n.	n.n.
19	600	545	91
20	0	n.n.	n.n.

Unter Einbeziehung einer 22%igen Wiederfindung erhielt man für die am halben MRL dotierten Schweinenieren Konzentrationen zwischen 250 und 350 µg/kg, dies entspricht einer Ausbeute zwischen 84% und 118%. Die am MRL dotierten Nieren lagen zwischen

von 420 und 620 µg/kg. Bezieht man den Korrekturfaktor in die Berechnung mit ein erhält man Ausbeuten im Bereich von 71% und 104 %. Für die am MRL dotierten Nieren wurden vielfach zu niedrige Werte erhalten. Die bei 300 µg/kg dotierten Proben wurden besser eingeordnet. Für eine erste Abschätzung der Screening-Ergebnisse ist die Berechnung aber geeignet. So konnte bei allen Proben eine Aussage zu der dotierten Konzentration gemacht werden.

Bei der verdeckten Kontrollanalyse wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse erhalten.

6.2.5 Analyse von gewachsenen Rückständen in Nieren

Die zuvor durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das erarbeitete Verfahren zur Probenaufarbeitung von tetracyclinhaltigen Proben geeignet ist. Auch die verdeckte Kontrollanalyse lieferte weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse. Bei allen untersuchten Proben handelte es sich allerdings nicht um reale Proben, sondern um selbst dotierte Proben, bei denen die Konzentration und das verwendete Tetracyclin bekannt waren. In der Routineanalytik ist dies nicht der Fall. Ob sich die erarbeitete Methode für den Einsatz in der Routineanalytik eignet, sollte an Proben mit gewachsenen Rückständen¹ überprüft werden. Diese wurden vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um eingefroren gelieferte, amtliche Proben, die mittels LC-MS/MS auf die Identifizierung des spezifischen Tetracyclinantibiotikums und seine Rückstandskonzentration untersucht wurden. Die Nierenproben wurden als gefrorene Homogenate erhalten. Sie konnten nach dem Auftauen direkt in den Stomacherbeutel eingewogen und wie unter 6.2 beschrieben weiter aufgearbeitet werden.

¹ Gewachsene Rückstände sind authentische Rückstände, die durch Medikation der Tiere mit Antibiotika in den Geweben vorhanden sind.

Insgesamt wurden 14 Proben mit gewachsenen Rückständen untersucht. Vor der Analyse war lediglich bekannt, von welcher Tierart die einzelnen Proben stammten und, dass 5 der 14 Proben rückstandsfrei waren. Angaben zu Menge und Art der Tetracyclinrückstände waren vorab nicht bekannt. Die Ergebnisse der LC-MS/MS- Untersuchungen wurden erst nach Übermittlung der Ergebnisse, die mittels SPR erhalten wurden, bekannt gegeben.

Für die Auswertung wurde eine Kalibriergerade mit Chlortetracyclin (in Probenpuffer) aufgenommen. Folgende Konzentrationen wurden angesetzt und gemessen: 0, 100 µg/kg, 300 µg/kg (halber MRL), 600 µg/kg (MRL) und 900 µg/kg (anderthalbfacher MRL).

Qualitative Auswertung

Die Auswertung wurde wie folgt durchgeführt:

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Δ RU-Werte für rückstandsfreie Nieren oberhalb der Werte für den Probenpuffer lagen (entspricht dem Nullwert der Kalibrierung). Dies ist wahrscheinlich auf Matrixinterferenzen an der Sensorchipoberfläche zurückzuführen. Ein Ergebnis sollte daher als rückstandsfrei beurteilt werden, wenn der Δ RU-Wert für die Probe höher liegt als der Wert des Probenpuffers. Alle Werte, die unterhalb des Probenpuffers liegen werden als positiv beurteilt. In der Messreihe wurde ein Δ RU-Wert von -35 als Nullwert erhalten.

In Tabelle 6-18 und Abbildung 6-12 sind die Ergebnisse der Messreihe dargestellt.

Tabelle 6-18: Responsewerte Δ RU der Proben. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion.

Probennummer	Tierart	Messwert [ΔRU]
1	Schwein	-231
2	Schwein	-11
3	Kalb	-112
4	Schwein	-473
5	Rind	-14
6	Rind	-150
7	Schwein	-621
8	Schwein	-300
9	Rind	-15
10	Schwein	-474
11	Schwein	-252
12	Schwein	-17
13	Schwein	-15
14	Kuh	-388

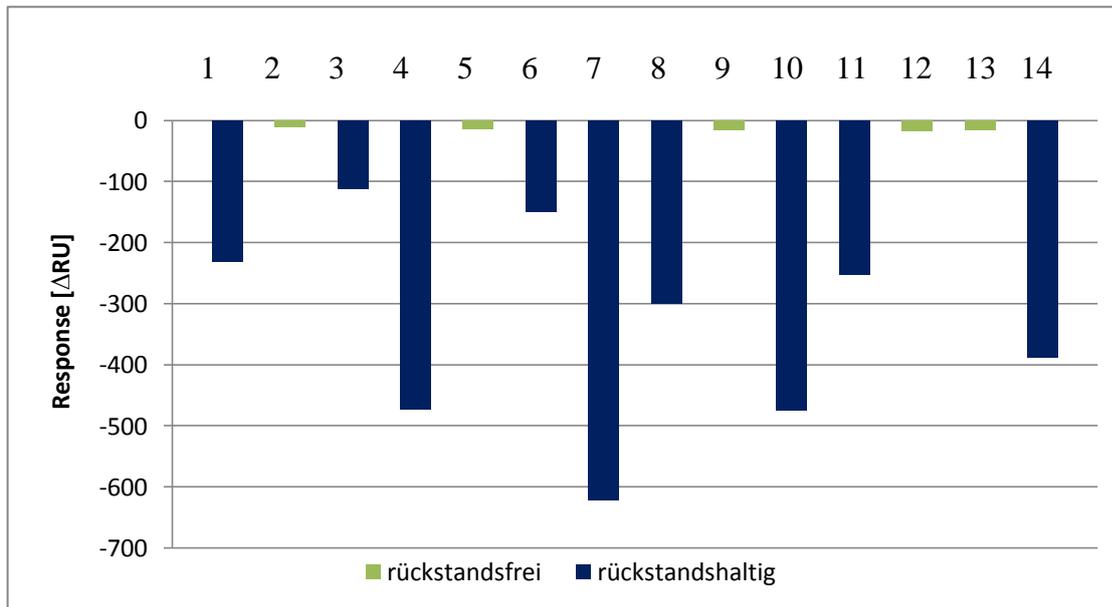


Abbildung 6-12: Graphische Darstellung der Δ RU-Werte der Proben mit gewachsenen Rückständen.

Bei fünf Proben lag der Δ RU-Wert deutlich über dem Probenpufferwert. Die Proben 2, 5, 9, 12 und 13 wurden daher als rückstandsfrei beurteilt. In den restlichen 9 Proben konnten Tetracyclinrückstände nachgewiesen werden.

In Tabelle 6-19 sind die qualitativen Ergebnisse, die mit SPR und LC-MS/MS erhalten wurden, gegenübergestellt.

Tabelle 6-19: Qualitativer Vergleich der Ergebnisse der zwei Methoden. (TC = Tetracyclin, CTC = Chlortetracyclin, OTC = Oxytetracyclin, DOX = Doxycyclin)

Probennummer	Tierart	Analyt	SPR	LC-MS/MS
1	Schwein	CTC	positiv	positiv
2	Schwein	-	negativ	negativ
3	Kalb	CTC	positiv	positiv
4	Schwein	DOX	positiv	positiv
5	Rind	-	negativ	negativ
6	Rind	OTC	positiv	positiv
7	Schwein	OTC	positiv	positiv
8	Schwein	DOX	positiv	positiv
9	Rind	-	negativ	negativ
10	Schwein	DOX	positiv	positiv
11	Schwein	TC	positiv	positiv
12	Schwein	-	negativ	negativ
13	Schwein	-	negativ	negativ
14	Kuh	TC	positiv	positiv

Der Vergleich mit den LC-MS/MS-Untersuchungen des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zeigt, dass bei der durchgeführten Untersuchung mittels SPR für alle eingesetzten Tetracycline und Tierarten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse erhalten wurden.

Quantitative Auswertung

Während eine qualitative Auswertung unabhängig von der Tierart und dem eingesetzten Tetracyclin ohne Probleme möglich war, gestaltet sich die quantitative Auswertung als schwierig. Bei der angewendeten Methode handelt es sich um ein Screeningverfahren für die gesamte Gruppe der Tetracycline. Es kann zwischen den einzelnen Tetracyclinen nicht unterschieden werden. Da neben der Matrix auch das eingesetzte Tetracyclin einen Einfluss auf das Ergebnis hat, kann hier nur eine Abschätzung der Konzentration erfolgen. Die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse sind alle auf Chlortetracyclin bezogen, da hier die geringste Wiederfindung mit der eingesetzten Methode erhalten wird. Aus zuvor durchgeführten Analysen ergab sich für das Chlortetracyclin in den verschiedenen Matrices im Mittel eine Wiederfindung von 20 %. Zur Abschätzung der Konzentration wird daher bei der Berechnung eine 20%ige Wiederfindung mit einbezogen. In Tabelle 6-20 sind die Ergebnisse beider Methoden gegenübergestellt.

**Tabelle 6-20: Untersuchung gewachsener Proben. Vergleich der quantitativen Ergebnisse der beiden Methoden. (TC = Tetracyclin, CTC = Chlortetracyclin, OTC = Oxytetracyclin, DOX = Doxycyclin)
Mit n.n. = nicht nachweisbar.**

Proben -nummer	Analyt	Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$] mit LC-MS/MS	Abgeschätzte Konzentration unter Einbeziehung einer Wiederfindung von 20% [$\mu\text{g}/\text{kg}$ CTC]
1	CTC	1070	400
2	-	n.n.	n.n.
3	CTC	361	200
4	DOX	1850	1100
5	-	n.n.	n.n.
6	OTC	703	250
7	OTC	3300	2250
8	DOX	600	550
9	-	n.n.	n.n.
10	DOX	1142	1100
11	TC	791	450
12	-	n.n.	n.n.
13	-	n.n.	n.n.
14	TC	2200	800

In Abbildung 6-13 sind die Ergebnisse der rückstandshaltigen Proben beider Methoden graphisch dargestellt.

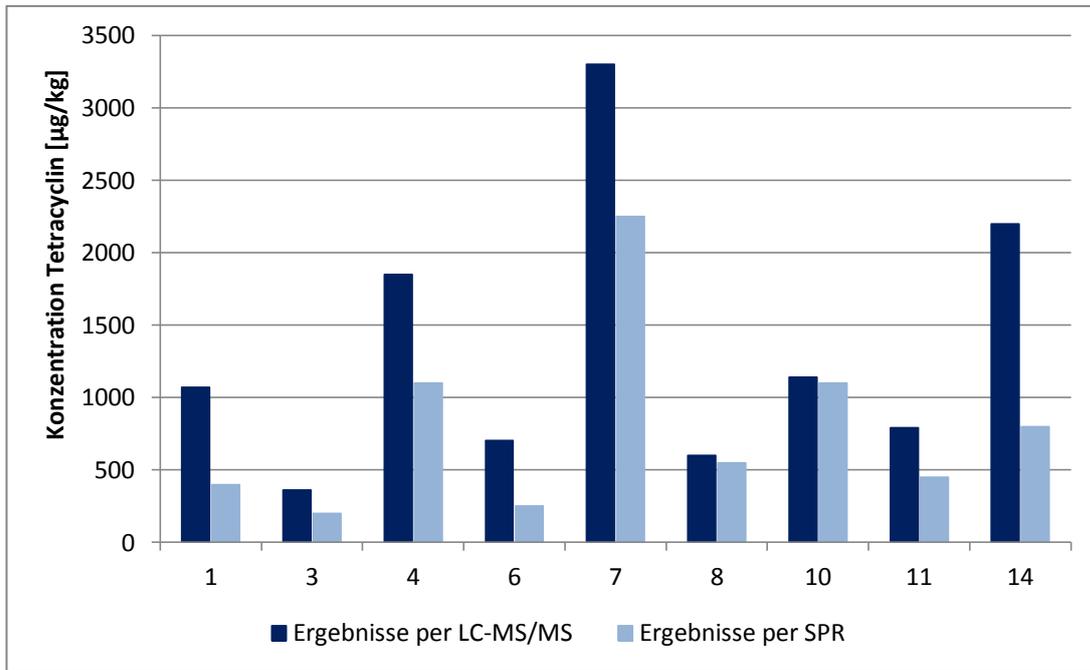


Abbildung 6-13: Vergleich der Ergebnisse in µg/kg, die mit LC-MS/MS und SPR erhalten wurden.

Bei allen Proben wurden mit der SPR-Methode geringere Tetracyclinegehalte ermittelt. Dies kann verschiedene Gründe haben. Bei der Betrachtung der ermittelten Gehalte muss beachtet werden, dass dieser Screeningassay nicht in der Lage ist, die Epimere zu erfassen [128]. Bei der Untersuchung von gewachsenem Material, d.h. Proben von Tieren, die mit Arzneimitteln behandelt wurden, ist von der Bildung von Epimeren auszugehen. Wie hoch der Anteil der Epimere ist, kann auf Grund der vielen Faktoren, die das Gleichgewicht zwischen Muttersubstanz und Epimer beeinflussen, nicht gesagt werden.

Einen weiteren Einfluss auf die Ergebnisse hat die Kalibrierung. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte für alle Proben über die Kalibrierkurve mit Chlortetracyclin. Da bei dem verwendeten Screeningverfahren die verschiedenen Tetracycline aber ein unterschiedliches Ansprechverhalten zeigen, wirkt sich dies auf die Berechnungen aus.

Diskussion der Ergebnisse

Der hier beschriebene Assay bietet den Vorteil, alle vier untersuchten Tetracycline qualitativ in der Matrix Niere zuverlässig nachweisen zu können. Auf Grund des unterschiedlichen Ansprechverhaltens der verschiedenen Tetracycline, ist bei der Quantifizierung nur eine Abschätzung der Konzentration möglich. Hinzu kommt, dass der Assay nicht in der Lage ist, Abbau- oder Umlagerungsprodukte zu erfassen. Die gesetzlich festgesetzten Höchstmengen beziehen sich aber bei Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin auf die Muttersubstanz und das 4-Epimer. Es ist also keine Aussage in Bezug auf eine Höchstmengenüberschreitung möglich. Anhand der Proben mit den gewachsenen Rückständen konnte aber gezeigt werden, dass die erarbeitete Methode erlaubt, eine qualitative Aussage darüber zu machen, ob eine Probe Tetracyclinrückstände enthält. Bei allen untersuchten Tetracyclinen und Matrices war eine Unterscheidung von tetracyclinfreien und tetracyclinhaltigen Proben auch am halben MRL möglich.

Bei dem verwendeten Assay handelt es sich um ein Screeningverfahren, das eine Ja/Nein-Aussage geben soll, ob Rückstände oberhalb einer bestimmten Konzentration vorhanden sind oder nicht. Ein Screeningtest soll nur die rückstandspositiven Proben identifizieren und dabei möglichst keine falsch-negativen und nur eine begrenzte Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen liefern. Zudem sollte ein Screeningverfahren schnell und mit wenig Aufwand durchführbar sein. Dies leistet das vorgestellte Verfahren sehr zuverlässig.

Nach EU-Vorgabe (Entscheidung 2002/657/EG) muss auf ein positives Screening eine Identifizierung, und falls erforderlich, eine Quantifizierung mit einer Bestätigungsmethode (im allgemeinen MS-Verfahren) erfolgen [61].

6.3 Weitere Versuche zu Probenaufarbeitungen

Es wurden weitere Probenaufarbeitungen getestet, die routinemäßig für unterschiedliche Matrices (z.B. Muskelfleisch oder Niere) eingesetzt werden sollte. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

6.3.1 Enzymatischer Abbau der Matrixproteine durch Protease

Häufig führen Proteine zu Problemen in der SPR. Sie können durch unspezifische Bindung an der Sensoroberfläche oder durch Wirkstoffadsorption die SPR-Messung stören. Durch den Einsatz der Protease Subtilisin sollten störende Matrixproteine zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut werden.

Dazu wurden die Nieren- und Muskelproben in der Moulinette zerkleinert und je 2 g eingewogen. Nachdem die Proben mit 5 g Puffer versetzt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert wurden, wurden sie mit 40 µl (50 mg/ml) Subtilisin versetzt und für 2 Stunden im Wasserbad bei 60°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Ultrafiltration (Vivaspin 4, Cut-off: 5000 DA, Polyethersulfon (PES)). Dies ist erforderlich, um die Protease vor der SPR-Analyse zu entfernen, da es sonst zu einem proteolytischen Abbau des Streptavidin an der Sensorchipoberfläche kommen könnte. Auch unspezifische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche wären möglich.

Für die Messreihe wurden Schweinenieren einmal vor der Aufarbeitung und einmal am Ende der Aufarbeitung nach der Ultrafiltration mit Tetracyclin an ihrem jeweiligen MRL dotiert. Zusätzlich wurde von jeder Matrix eine undotierte Probe (blank) aufgearbeitet.

Tabelle 6-21: Aufarbeitung der dotierten und undotierten Proben mit Protease: 40 µl Subtilisin zu jeder Probe, Inkubation bei 60°C im Wasserbad und anschließender Ultrafiltration. Die Proben wurden am MRL dotiert: Niere 600 µg/kg, Muskel 100 µg/kg (beide Schwein). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion.

Probe (Schwein)	blank [Δ RU]	dotiert vor der Ultrafiltration [Δ RU]	dotiert nach der Ultrafiltration [Δ RU]
Niere	-34	-57	-504
Muskel	-18	-34	-53

Ein Vergleich der erhaltenen Werte zeigt, dass bei der Proteasebehandlung mit anschließender Ultrafiltration nur wenig Tetracyclin nachgewiesen werden kann. Bei der Nierenprobe wurde bei der nach der Ultrafiltration dotierten Probe ein Messwert von ca. -500 RU erhalten. Eine Dotierung vor der Aufarbeitung führte zu einem Messwert von -50 RU. Der Unterschied zu der undotierten Probe war damit sehr gering. Die Messwerte der Muskelprobe lagen beide (dotiert vor und nach der Ultrafiltration) mit ca. -50 RU und ca. -35 RU sehr nah an dem Messwert der undotierten Probe mit -18 RU.

In einer weiteren Messreihe sollte geklärt werden, ob das Subtilisin und/oder die zweistündige Inkubation bei 60°C zu den niedrigen Wiederfindungen führt. Daher wurde der Versuch mit einer weiteren Niere und einer Tetracyclinlösung in Puffer wiederholt. Die Niere wurde wie zuvor beschrieben dotiert und aufgearbeitet. Zusätzlich wurden zwei Tetracyclinlösungen wie die Nierenprobe aufgearbeitet. Dazu wurden 7 g Puffer eingewogen und wie die Nierenprobe mit Tetracyclin am MRL dotiert, zwei Stunden im Wasserbad inkubiert und anschließend ultrafiltriert. Dabei wurde nur eine Standardlösung mit Subtilisin versetzt. Bei der anderen Standardlösung erfolgte die Aufarbeitung ohne den Zusatz der Protease.

Tabelle 6-22: Vergleich der Aufarbeitung von Nierenproben und Standards mit und ohne Subtilisin. Die dargestellten Mittelwerte beziehen sich auf eine Dreifachinjektion.

	Aufarbeitung ohne Subtilisin [Δ RU]	Aufarbeitung mit Subtilisin [Δ RU]
Tetracyclinlösung [600 μ g/kg]	-574	-688
	Dotierung vor der Ultrafiltration [Δ RU]	Dotierung nach der Ultrafiltration [Δ RU]
Niere dotiert am MRL [600 μ g/kg]	-97	-694

Bei der Aufarbeitung der Niere wurden die gleichen Ergebnisse wie bei den zuvor durchgeführten Untersuchungen erhalten. Der Messwert der Tetracyclinlösung, die mit Subtilisin inkubiert wurde, lag im selben Bereich wie der Messwert der Nierenprobe, die nach der Ultrafiltration dotiert wurde. Die einzelnen Schritte der Aufarbeitung haben auf die Tetracyclinlösung keinen Einfluss. Es kommt weder zu einem Abbau durch die

zweistündige Inkubation bei 60°C, noch zu einem Verlust des Tetracyclins durch die Ultrafiltration.

Der Verlust des Tetracyclins ist also nicht auf die reinen Schritte der Aufarbeitung zurückzuführen, sondern ergibt sich aus dem proteolytischen Abbau der Matrix. Möglicherweise lagert sich das Tetracyclin bei dem enzymatischen Abbau der Proteine an die entstehenden kleineren Fragmente an. Bei der Ultrafiltration bleibt das „gebundene“ Tetracyclin dann mit den Proteinen und Peptiden im Filter zurück. Nur das noch „frei“ in der Lösung vorhandene Tetracyclin kann den Filter passieren.

In einer weiteren Messreihe sollte diese Möglichkeit untersucht werden. Eine längere Inkubationsdauer führt zu einem stärkeren proteolytischen Abbau der Proteine und damit zu kleineren Fragmenten. Es wurde überprüft, wie sich dies auf die Wiederfindung des Tetracyclins auswirkt. Nierenproben und Tetracyclinstandardlösungen wurden unterschiedlich lange inkubiert. Die Tetracyclinstandards wurden einmal mit und einmal ohne Subtilisin inkubiert.

Tabelle 6-23: Proteasebehandlung von Nierenproben und Tetracyclinlösung mit unterschiedlich langer Inkubationszeit und anschließender Ultrafiltration.

Dauer der Inkubation	Tetracyclin-lösung ohne Subtilisin [Δ RU]	Tetracyclin-lösung mit Subtilisin [Δ RU]	Niere dotiert vor der Ultrafiltration [Δ RU]	Niere dotiert nach der Ultrafiltration [Δ RU]
2 Stunden	-210	-210	-25	-199
3 Stunden	-201	-204	-7	-
4 Stunden	-191	-202	+11	-

Die Proteasebehandlung der Tetracyclinlösung lieferte bei allen Inkubationen vergleichbare Ergebnisse zu den Inkubationen ohne Proteasebehandlung. Die Niere, die am Ende der Aufarbeitung dotiert wurde, zeigte einen Messwert in der gleichen Größenordnung wie die Lösungen von Tetracyclin in Puffer.

Bei den Nieren, die am Anfang der Aufarbeitung mit Tetracyclin dotiert wurden, zeigte sich hingegen ein Trend bei den Messwerten. Je länger die Inkubation dauert, desto höher

wird der Messwert. Nach einer Inkubation von vier Stunden wurde sogar ein positiver Wert erhalten, der zeigt, dass unspezifische Bindungen zugenommen haben. Durch die längere Inkubation werden die Proteine durch die Protease weiter zu kleineren Fragmenten abgebaut. Die Proteine sind vermutlich soweit abgebaut worden, dass ein Teil der kleineren Fragmente durch den Filter nicht mehr zurückgehalten werden. Diese können dann unspezifisch an die Sensorchipoberfläche binden und zu positiven Δ RU-Werten führen.

Die Behandlung mit Protease ist als Probenaufarbeitung für die SPR nicht geeignet, da ein Großteil des Tetracyclins mit den Abbauprodukten in der Filtrationseinheit verbleibt und nicht mehr nachweisbar ist.

6.3.2 Aufarbeitung mittels Ultra-Turrax, Ultrazentrifugation und Ultrafiltration

Es wurde untersucht, ob sich für die Probenaufarbeitung eine Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax und eine anschließende Ultrazentrifugation eignen. Dabei sollten Matrixstörungen beseitigt und eine gute Wiederfindung erhalten werden. Dazu wurden die in der Moulinette vorzerkleinerten Proben mit Probenpuffer versetzt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend erfolgte für 30 Minuten eine Zentrifugation (Vorzentrifugation) der homogenisierten Probe bei 6000 g. Der Überstand wurde anschließend bei 110000 g ultrazentrifugiert. Die Aufarbeitung wurde mit Muskelfleisch (Huhn) und Niere (Schwein) durchgeführt. Der erhaltene Überstand war klar und rosa bis rot gefärbt. Nach der Ultrazentrifugation wurde ein Teil der Proben unfiltriert, ein anderer Teil filtriert (PVDF, Porengröße 0,45 μ m und Ultrafiltrationseinheit mit Filter aus PES, MWCO 5 kDa) zur SPR-Analyse eingesetzt.

Tabelle 6-24: Unspezifische Matrixbindung von Muskelfleisch und Niere filtriert und unfiltriert. Eingesetzte Filtrationseinheiten: Spritzenfilter aus PVDF, Porengröße 0,45 μm ; Sartorius Vivaspin 4, Polyethersulfon (PES), Cut-off 5 kDa

Muskelfleisch unfiltriert [Δ RU]	Muskelfleisch filtriert PVDF [Δ RU]	Niere unfiltriert [Δ RU]	Niere filtriert PVDF und ultrafiltriert PES MWCO 5 kDa [Δ RU]
3133	2829	4029	-21

In Tabelle 6-24 ist die Wirkung der Filtration auf die unspezifischen Wechselwirkungen dargestellt. Bei den unfiltrierten Proben wurden deutlich positive Δ RU-Werte erhalten. Bei der filtrierten Muskelfleischprobe über einen PVDF-Filter war nur eine geringe Reduktion der unspezifischen Wechselwirkungen zu erkennen. Die unfiltrierte Nierenprobe zeigte den höchsten Δ RU-Wert. Die vor der Injektion ultrafiltrierte Nierenprobe ergab ein klares, farbloses Filtrat, das zur SPR-Analyse eingesetzt wurde. Hier war eine deutliche Minderung der unspezifischen Wechselwirkung durch die Ultrafiltration zu erkennen. Es wurde ein negativer Δ RU-Wert erhalten. Für die unspezifischen Wechselwirkungen scheinen Makromoleküle, wie Proteine, verantwortlich zu sein, die durch den Ultrafiltrationsschritt abgetrennt werden. Die Ultrafiltration trägt damit dazu bei, Komponenten, die mit der Sensorchipoberfläche unspezifisch wechselwirken, zu entfernen.

In Abbildung 6-14 ist die Probenaufarbeitung schematisch dargestellt. Die genauen Arbeitsanweisungen finden sich in Kapitel 9 Material und Methoden.

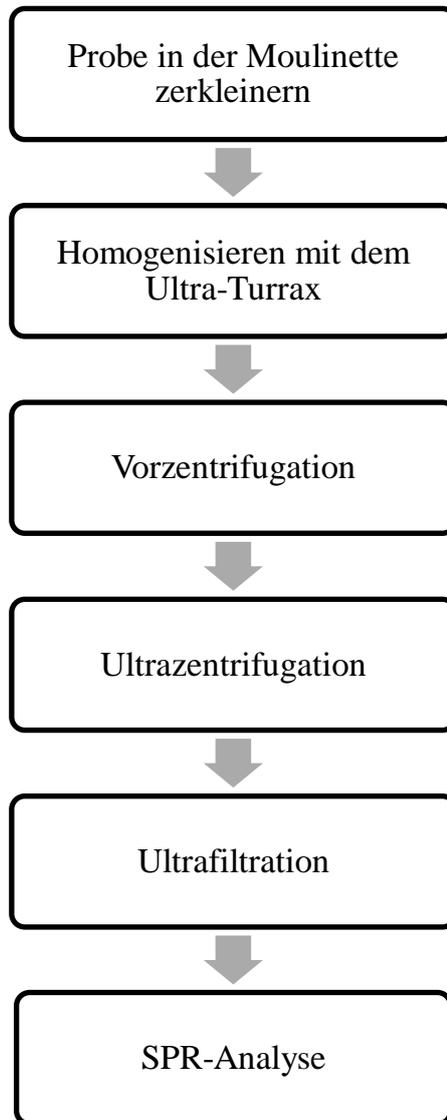


Abbildung 6-14: Schema der Aufarbeitung mit dem Ultra-Turrax und anschließender Ultrazentrifugation und Ultrafiltration.

Zunächst wird die Probe in der Moulinette zerkleinert. Im Anschluss erfolgt die Homogenisierung der Probe mit Probenpuffer mittels Ultra-Turrax. Der Überstand wird zentrifugiert und anschließend ultrazentrifugiert. Nach der Ultrafiltration erfolgt die SPR-Analyse.

Einfluss unterschiedlicher Filter

Nachdem gezeigt wurde, dass man auf die Ultrafiltration zum Abtrennen von störenden Matrixbestandteilen nicht verzichten kann, wurden zwei verschiedene Filtrationseinheiten getestet. Diese unterschieden sich im Material und Cut-off. Es wurde eine Muskelfleischprobe (Huhn) und eine Nierenprobe (Schwein) wie in Abbildung 6-14 dargestellt aufgearbeitet. Vor der Ultrafiltration wurden die Proben an ihrem jeweiligen MRL mit Tetracyclin dotiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-25 dargestellt.

Tabelle 6-25: Reduzierung von Matrixstörungen mittels Ultrafiltration. Eingesetzte Filtrationseinheiten: Sartorius Vivaspin 4, Polyethersulfon (PES), Cut-off 5kDa; Millipore Amicon Ultra 4, regenerierte Cellulose, Cut-off 3 kDa. Zentrifugation für 30 min bei 6000 g. Muskelfleisch und Niere wurden vor der Ultrafiltration mit Tetracyclin an ihrem jeweiligen MRL dotiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachinjektion.

	Muskelfleisch am MRL dotiert (100 µg/kg) [Δ RU]	Niere am MRL dotiert (600 µg/kg) [Δ RU]
Filtriert, PES		
MWCO 5kDa	-82	-477
Filtriert, Reg. Cellulose		
MWCO 3kDa	-90	-492

Mit beiden Filtrationseinheiten wurden deutlich negative ΔRU-Werte erhalten. Die Ultrafiltration trägt somit dazu bei, Matrixkomponenten, die unspezifisch an der Sensoroberfläche wechselwirken, zu entfernen. Es war auch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Dotierungsniveaus festzustellen. Es wurden wesentlich negativere Werte bei einer Konzentration von 600 µg/kg erhalten.

Zusätzlich zu den Proben wurden Tetracyclinlösungen in Probenpuffer unter den gleichen Bedingungen gemessen. Bei dieser Messung sollte geprüft werden, ob eine Adsorption des Tetracyclins an die Filtermembran erfolgt. Dazu wurden die Lösungen unfiltriert und filtriert gemessen. Die Konzentrationen der Standards entsprachen 100 µg/kg und 600 µg/kg.

Tabelle 6-26: Tetracyclinstandardlösungen in Probenpuffer. die Konzentration entspricht den MRL-Werten von Muskelfleisch und Niere. Eingesetzte Filtrationseinheiten: Sartorius Vivaspin 4, Polyethersulfon (PES), Cut-off 5 kDa; Millipore Amicon Ultra 4, regenerierte Cellulose, Cut-off 3 kDa. Zentrifugation für 30 Min bei 6000 g. Die dargestellten Mittelwerte beziehen sich auf eine Dreifachinjektion.

	Tetracyclinlösung	Tetracyclinlösung
	100 µg/kg	600 µg/kg
	[Δ RU]	[Δ RU]
Unfiltriert	-323	-492
Filtriert, PES MWCO 5 kDa	-189	-452
Filtriert, Reg. Cellulose MWCO 3 kDa	-219	-464

Die Filtration der Tetracyclinlösungen in Puffer lieferte vergleichbare Ergebnisse wie die Filtration der Proben. Ein Vergleich der unfiltrierten zu den filtrierten Lösungen zeigte, dass mit dem Ultrafiltrationsschritt auch ein geringer Verlust an Tetracyclin, durch Adsorption des Tetracyclins an die Filtrationsmembran, einhergeht. Dieser fiel bei den Filtrationseinheiten aus regenerierter Cellulose kleiner aus. Für weitere Untersuchungen wurde für die Ultrafiltration daher der Filter aus regenerierter Cellulose verwendet.

Verluste bei der Aufarbeitung

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen wurden die Proben erst vor dem Ultrafiltrationsschritt dotiert. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, wie groß der Verlust an Tetracyclin bei der gesamten Aufarbeitung ist.

Eine Nierenprobe (Schwein) wurde an unterschiedlichen Stellen der Aufarbeitung mit Tetracyclin am MRL dotiert. So sollte nachvollzogen werden an welchen Stellen der Aufarbeitung wie viel Tetracyclin „verloren“ geht.

An folgenden Punkten der Aufarbeitung wurde dotiert:

- Dotierung am Anfang der Aufarbeitung (nach Zerkleinerung in der Moulinette)
- Dotierung nach dem Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax
- Dotierung nach der Vorzentrifugation
- Dotierung nach der Ultrazentrifugation
- Dotierung am Ende der Aufarbeitung nach der Ultrafiltration

Zusätzlich wurde eine undotierte Probe mit aufgearbeitet (blank). Die Aufarbeitung der Proben erfolgte je zweimal (Niere 1 und Niere 2). Alle Proben wurden je viermal injiziert. Zum Vergleich wurde ein Tetracyclinstandard in Probenpuffer mit einer Konzentration von 600 µg/kg injiziert.

Tabelle 6-27: Verluste an Tetracyclin während der Aufarbeitung. Dotierung der Niere entspricht 600 µg/kg. Ultrafiltration mit Millipore Amicon Ultra 4, regenerierte Cellulose, Cut-off 3 kDa. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte einer Vierfachinjektion.

	Niere 1	Niere 2
	[Δ RU]	[Δ RU]
Blank	-20	-25
Dotiert am Anfang der Aufarbeitung	-274	-272
Dotiert nach dem Ultra-Turrax	-265	-274
Dotiert nach der Vorzentrifugation	-295	-298
Dotiert nach der Ultrazentrifugation	-302	-303
Dotiert nach der Ultrafiltration	-340	-343
Tetracyclinstandard	-348	

Bei beiden Nieren wurden für die jeweilig gleichen Dotierungsniveaus vergleichbare Messwerte erhalten. Das lässt auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen. Anhand der erhaltenen Messwerte ist ein Verlust an Tetracyclin während der Aufarbeitung zu erkennen. Aber selbst die Proben, die am Anfang der Aufarbeitung dotiert wurden, lassen sich klar von den undotierten Proben unterscheiden.

An zwei Punkten der Aufarbeitung war ein etwas größerer Verlust an Tetracyclin zu erkennen. Einmal durch die Vorzentrifugation und einmal bei der Ultrafiltration. Auf die Ultrafiltration kann bei der Aufarbeitung der Proben nicht verzichtet werden, da sie die unspezifischen Wechselwirkungen mit der Sensorchipoberfläche verhindert. Die Verluste, die durch diesen Aufarbeitungsschritt entstehen, müssen in Kauf genommen werden.

Anders sieht es bei der Vorzentrifugation aus. Hier haben die Δ RU-Werte einen Unterschied von ca. 30 RU. Daher wird im nächsten Schritt überprüft, ob auf die Vorzentrifugation bei der Probenaufarbeitung verzichtet werden kann. Durch das Auslassen des Schrittes würde sich die Aufarbeitung zudem um 30 Minuten verkürzen. Gerade in der Routineanalytik sollte eine Probenvorbereitung einfach und schnell sein. Die größte Zeitersparnis würde allerdings der Wegfall der Ultrazentrifugation bringen. Daher sollte im nächsten Schritt eine mögliche Verkürzung der Aufarbeitung, ohne zu große Verluste an Tetracyclin, durch den Wegfall einzelner Schritte getestet werden.

Verkürzung der Aufarbeitung

Um die Möglichkeit einer zeitlichen Verkürzung der Probenaufarbeitung zu untersuchen, wurde die Aufarbeitung einmal ohne die Vorzentrifugation und einmal ohne die Ultrazentrifugation durchgeführt und mit den Messwerten einer vollständig durchgeführten Probenaufarbeitung verglichen. Als Proben wurden, wie bei der Messreihe zuvor, am MRL dotierte Schweinenieren verwendet. Jede Probenaufarbeitung wurde zweimal durchgeführt. Des Weiteren wurden zum Vergleich zwei undotierte Proben und eine Tetracyclinstandardlösung (600 μ g/kg) mitgemessen.

Tabelle 6-28: Vergleich der Δ RU-Werte bei den verkürzten Aufarbeitungen. Die Schweinenieren wurden mit Tetracyclin am MRL dotiert.

	Niere 1	Niere 2
	[Δ RU]	[Δ RU]
Blank	-25	-24
Vollständige Aufarbeitung	-227	-234
Aufarbeitung ohne Vorzentrifugation	-216	-204
Aufarbeitung ohne Ultrazentrifugation	-199	-189
Tetracyclinstandard	-322	

Alle aufgearbeiteten dotierten Proben ließen sich eindeutig von den undotierten Proben unterscheiden. Bei einem Verzicht auf die Vorzentrifugation war der Verlust an Tetracyclin geringer als bei Verzicht auf die Ultrazentrifugation. Daher wurde bei den weiteren Untersuchungen auf die Vorzentrifugation verzichtet. Die Ultrazentrifugation wurde hingegen beibehalten. Auf beide Zentrifugationsschritte zusammen kann nicht verzichtet werden, da die Zentrifugationsschritte als Vorreinigung dienen. Ein großer Teil der festen Bestandteile setzt sich bei der Zentrifugation als Pellet ab und der Überstand kann dann für die Ultrafiltration verwendet werden. Würde man direkt nach der Homogenisierung die Ultrafiltration anschließen, würden sich die Poren des Filters sofort zusetzen und man würde kein Filtrat für die SPR-Analyse erhalten.

Bestimmung von Tetracyclin in Schweinenieren

Im nächsten Schritt wurden zusätzlich zu den undotierten und am MRL dotierten Nieren auch am halben MRL dotierte Proben untersucht, um zu überprüfen, ob auch in diesem Konzentrationsbereich eine eindeutige positive Bestimmung möglich ist. Des Weiteren wurde eine Tetracyclinkalibrierung in Probenpuffer in einem Konzentrationsbereich von 0-900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ angesetzt. Über die Kalibrierkurve wurden dann der Gehalt der Proben und

damit die Wiederfindung berechnet. Die Messung erfolgte auf einem frisch immobilisierten Chip.

Tabelle 6-29: Dargestellt sind Messwerte der Kalibrierung und der aufgearbeiteten Proben, die berechnete Konzentration und Wiederfindung. Die Schweinenierenproben wurden mit Tetracyclin (TC) am MRL (600µg/kg) und am halben MRL (300 µg/kg) dotiert. Die Kalibrierung wurde in Probenpuffer angesetzt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus einer Vierfachinjektion.

Kalibrierung		Probe	Messwert [Δ RU]	Berechnete Konzentration [µg/kg]	Wieder- findung [%]
Konzentration TC [µg/kg]	Messwert [Δ RU]				
0	-122	Niere dotiert	-314	222	74
100	-226	halber MRL			
300	-364				
600	-502	Niere dotiert	-515	609	102
900	-624	MRL			

Die über die Kalibrierung berechneten Konzentrationen an Tetracyclin stimmten gut mit den dotierten Konzentrationen überein. Bei der am halben MRL dotierten Probe erhielt man eine Wiederfindung von 74 % und bei der am MRL dotierten Probe erhielt man eine Wiederfindung von 102 %. Auch mit der verkürzten Aufarbeitung ist es möglich Proben für die SPR-Analyse aufzuarbeiten.

Aufarbeitung ohne Zusatz von Puffer

Es wurde versucht, ob eine Aufarbeitung ohne den Zusatz von Probenpuffer möglich ist, ob es also eine Möglichkeit gibt den „reinen“ Fleischsaft zu erhalten. Dazu wurden eine Muskelfleischprobe (Huhn) und eine Nierenprobe (Schwein) in der Moulinette zerkleinert. Anschließend wurden 10 g der homogenisierten Muskelprobe eingewogen und 20 Minuten bei 6000 g zentrifugiert. Dabei wurde kein Fleischsaft erhalten.

Auch die Nierenprobe (10 g) wurde zunächst in der Moulinette zerkleinert und anschließend bei 6000 g 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der erhaltene Nierensaft abdekantiert. Dieser Schritt wurde insgesamt siebenmal Mal durchgeführt. Dabei wurden ca. 2 ml Nierensaft erhalten. Auch wenn bei der Nierenprobe Fleischsaft erhalten wurde, steht der zeitliche Aufwand für die sieben Mal durchgeführte Zentrifugation in keinem angemessenen Verhältnis dazu. Daher eignet sich diese Probenaufarbeitung nicht für eine Routineanalytik.

Diskussion der Ergebnisse

Das erarbeitete Verfahren mit dem Ultra-Turrax eignet sich zur Probenaufarbeitung für die SPR-Analyse. Proben, die mit identischen Tetracyclin-Konzentrationen dotiert wurden, zeigten bei der SPR-Analyse Messwerte im selben Bereich. Mit dem Verfahren werden reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Anhand der Kalibrierung und der damit berechneten Konzentration konnte gezeigt werden, dass der Analytverlust während der Aufarbeitung gering ist. Die Wiederfindungen der am MRL und am halben MRL dotierten Proben lagen mit 74 und 102 % in einem sehr guten Bereich.

In einem weiteren Schritt konnte die Aufarbeitung verkürzt werden, indem gezeigt wurde, dass man auf die Vorzentrifugation verzichten kann, ohne einen großen Verlust an Tetracyclin in Kauf nehmen zu müssen.

Für die Ultrafiltration konnte gezeigt werden, dass sich die Filtrationseinheit aus regenerierter Cellulose am besten für die Aufarbeitung eignet.

Trotz der guten Ergebnisse bei der Aufarbeitung, gibt es bei der durchgeführten Methode Nachteile. Nachteilig an dieser Probenaufarbeitung ist der zeitliche Aufwand der

Homogenisierung der Probe. Die Arbeitsschritte an sich sind zwar schnell durchzuführen, aber die Reinigung der Moulinette und vor allem des Ultra-Turrax nehmen viel Zeit in Anspruch. Nach jeder Probe müssen beide Geräte gründlich gereinigt werden, um eine Verschleppung des Tetracyclins zu vermeiden. Dabei stellt die Reinigung des Ultra-Turrax das größere Problem dar. Dieser kann nicht nur von außen abgespült werden, sondern muss nach jeder Probe auseinandergebaut werden, da einzelne Fasern der Probe in den Messern des Gerätes verbleiben.

Ein weiterer nachteiliger Aspekt ist der Einsatz der Ultrazentrifuge. Im Gegensatz zu Tischzentrifugen zählen Ultrazentrifugen, auf Grund ihres hohen Preises, nicht zur Grundausstattung eines Labors. Daher sollte bei der weiteren Erarbeitung einer Probenaufarbeitung überprüft werden, ob der Zentrifugationsschritt auch in einer handelsüblichen Tischzentrifuge durchgeführt werden kann.

Aus diesen Gründen wurde trotz der guten Wiederfindungen eine Probenhomogenisierung mit dem Stomacher erarbeitet. Diese Aufarbeitung wird in Kapitel 6.2 ausführlich beschrieben und behandelt.

Zum Teil wurden die Aufarbeitungsmethoden auch für Muskelfleischproben getestet. Die ersten SPR-Messungen zeigten allerdings, dass auf Grund des sechsfachniedrigeren MRLs (im Vergleich zu der Matrix Niere) eine Unterscheidung zwischen am MRL dotierten und undotierten Proben kaum möglich war. Es war erkennbar, dass ohne aufwendige Probenaufarbeitung die Grenzen der SPR erreicht waren. Daher wurde bei den weiteren Aufarbeitungen die Präferenz auf die Matrix Niere gelegt.

6.4 Robustheit

In der Entscheidung der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG betreffend die Durchführung von Analysenmethoden sind Leistungsmerkmale aufgeführt, die für bestimmte Analysenverfahren bestimmt werden müssen. Für qualitative Screeningmethoden müssen demnach neben Nachweisgrenze, Selektivität und Spezifität auch Anwendbarkeit, Robustheit und Stabilität überprüft werden [61].

		Nachweisgrenze CC β	Entscheidungs- grenze CC α	Richtigkeit/ Wiederfindung	Präzision	Selektivität/ Spezifität	Anwendbarkeit/ Robustheit/ Stabilität
Qualitative Methoden	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Quantitative Methoden	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = Screeningmethoden; C = Bestätigungsmethoden; + = Bestimmung ist obligatorisch.

Abbildung 6-15: Klassifikation von Analysenverfahren nach den Leistungsmerkmalen, die bei einer Validierung bestimmt werden müssen (aus: Entscheidung 2002/657/EG [61])

Der von Möller et al. entwickelte Screening-Assay wurde von Möller auf Selektivität und Spezifität untersucht [127]. Außerdem wurde die Nachweisgrenze für Tetracyclin in der Matrix Honig bestimmt. Andree prüfte die Stabilität und Robustheit des verwendeten Assays. Dabei lag der Fokus auf dem Einfluss von unterschiedlichen Chargen und der Lagerstabilität der verwendeten Reagenzien (TetR, *tetO*) und Sensorchips [130]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Stabilität von Chlortetracyclinlösungen und der Einfluss des verwendeten Laufpuffers in Hinblick auf Stabilität und Robustheit des Systems untersucht.

Unter Robustheit versteht man die Anfälligkeit einer Analysenmethode gegenüber Änderungen in den Versuchsbedingungen. Sie kann als eine Liste von Bedingungen ausgedrückt werden, unter denen die Methode wie beschrieben oder mit geringfügigen Änderungen angewendet werden kann. Haben Bedingungen Einfluss auf das Analyseergebnis, ist dies entsprechend anzugeben [61].

6.4.1 Lagerstudie Chlortetracyclinlösungen

Nach der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen gehört zu einer Validierung für ein Screeningverfahren die Überprüfung der Stabilität der Analyten. In vorangegangenen Messungen zeigte sich immer wieder ein Abbau des Chlortetracyclins während der Messreihen. Daher sollte die Stabilität von Chlortetracyclinlösungen unter verschiedenen Lagerbedingungen überprüft werden.

Bei der folgenden Lagerstudie wurde der Einfluss der Lagerdauer, der Lagertemperatur, der Konzentration der Lösung und der Lichteinwirkung überprüft. In Anlehnung an die Entscheidung 2002/657/EG wurde folgendes Lagerungsschema verwendet:

- 20°C; dunkel
- + 4-8°C; dunkel
- + 20°C; dunkel
- + 20°C, hell

Bei jeder Bedingung wurde eine Chlortetracyclinstammlösung (0,5 mg/ml in Reinstwasser) und verschiedene Verdünnungen (17, 50, 100 und 150 ng/ml Chlortetracyclin in Probenpuffer) in Greinertubes gelagert. Insgesamt betrug die Lagerdauer 5 Wochen. Bei den zuvor durchgeführten Messungen zeigte sich bei Wiederholmessungen in einer Messreihe schon eine Abnahme der Chlortetracyclinkonzentration innerhalb von wenigen Stunden, daher erfolgte die erste Messung der Standards nach einem Tag Lagerung. Weitere Messungen folgten nach 1, 2, 3 und 5 Wochen. Für eine Referenzkalibrierung wurde eine frische Chlortetracyclinlösung angesetzt und entsprechend verdünnt.

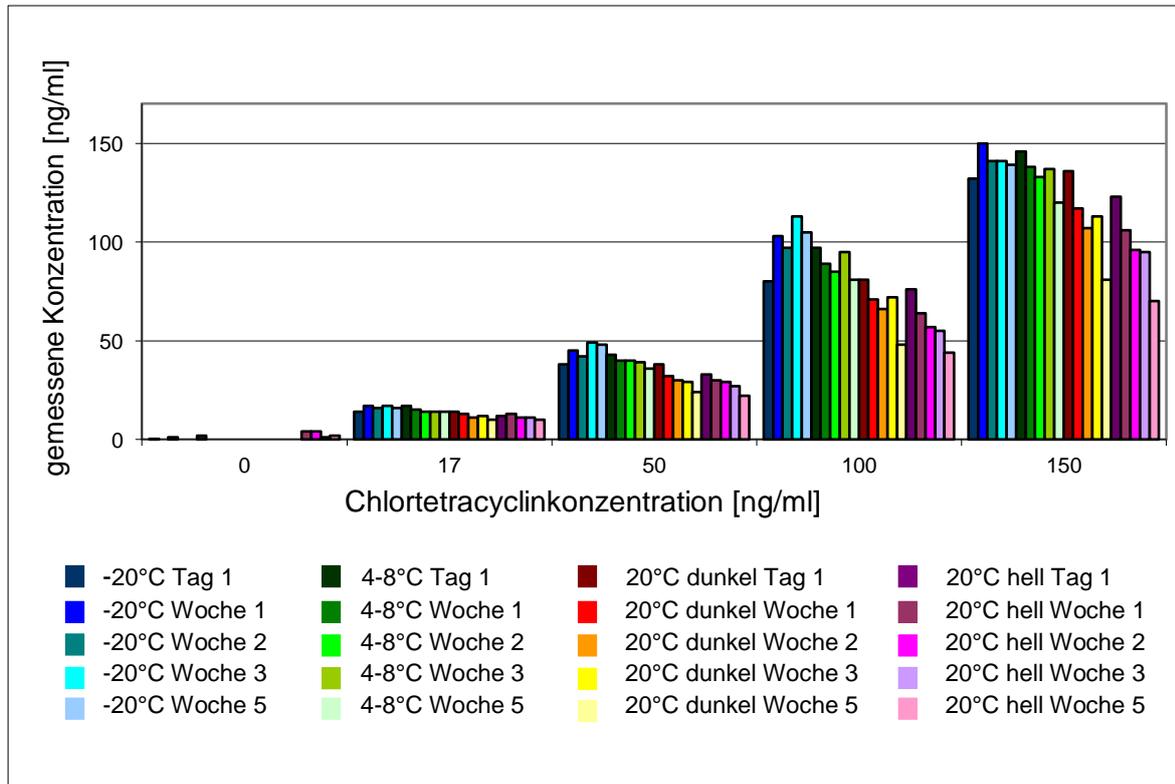


Abbildung 6-16: Ergebnis der Lagerstudie der Stammlösung (0,5 mg/ml Chlortetracyclin in Reinstwasser). Es ist der Einfluss der Lagerdauer, der Lagertemperatur und der Lichteinwirkung während der Lagerung dargestellt. Für die Messung wurde die Stammlösung in Probenpuffer auf 17, 50, 100 und 150 ng/ml verdünnt. Als Blindwert diente Probenpuffer.

In Abbildung 6-16 ist der Einfluss von Lagerdauer, Lagertemperatur und Lichteinwirkung auf die Chlortetracyclinkonzentration der Standardlösungen dargestellt. Der Vergleich der unterschiedlichen Lagertemperaturen bei den einzelnen Konzentrationen zeigt, dass mit höherer Temperatur weniger Chlortetracyclin in den Lösungen gemessen wird. Dies war zu erwarten, da Epimerisierungs- oder Abbaureaktionen bei Chlortetracyclin bei höheren Temperaturen schneller ablaufen. Ein weiterer Trend, der beobachtet werden kann, ist dass auch mit zunehmender Lagerdauer weniger Chlortetracyclin in den Lösungen gemessen wird. Dieser Trend zeigt sich bei der Lagerung im Kühlschrank und bei den Lösungen, die bei Raumtemperatur gelagert wurden. Die größte Abnahme der Konzentration erfolgt bei den Chlortetracyclinlösungen, die bei Raumtemperatur unter Lichteinwirkung gelagert wurden. Schon nach einem Tag können nur noch ca. 80% der ursprünglichen Chlortetracyclinkonzentration in der Lösung mit der höchsten Konzentration nachgewiesen werden, nach 5 Wochen nur noch ca. 45%.

In Tabelle 6-30 ist die maximale Abnahme der Chlortetracyclinkonzentration der einzelnen Standardlösungen bei drei unterschiedlichen Lagerbedingungen dargestellt.

Tabelle 6-30: Maximale Abnahme der Konzentration der einzelnen Standardlösungen in Reinstwasser bei unterschiedlicher Lagertemperatur in Prozent. Die maximale Abnahme der Konzentration wurde in dieser Versuchsreihe bei der letzten Messung nach 5 Wochen erreicht.

Temperatur	Chlortetracyclinkonzentration [ng/ml]			
	17	50	100	150
4-8°C	18%	28%	19%	20%
20°C dunkel	41%	52%	52%	46%
20°C hell	41%	56%	56%	53%

Anhand der Werte ist der Einfluss der Temperatur gut zu erkennen. Während bei der Kühlschranklagerung (4-8°C) die gemessene Konzentration aller drei Konzentrationen nur um 20 bis 30% abgenommen hat, wurde für die Lösungen, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, eine Abnahme von ca. 50% gemessen. Die Einwirkung von Licht hatte auf die Lagerung hingegen keinen großen Einfluss.

Die Lagerung im Gefrierschrank ist in dieser Tabelle nicht mit aufgenommen worden. Schaut man sich die Abbildung 6-16 an, so scheinen die Werte für diese Lagertemperatur keinem klaren Trend zu folgen, sondern willkürlich zu schwanken. Alle Werte liegen allerdings nah um die 100%, innerhalb der Unpräzision, mit der gerechnet werden muss. Gründe für diese Schwankungen sind auf S. 103 ausführlich beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lagerung von Chlortetracyclin in Reinstwasser im Kühlschrank oder Gefrierschrank zu einem langsameren Ablauf von Epimerisierungen und Abbaureaktionen führt.

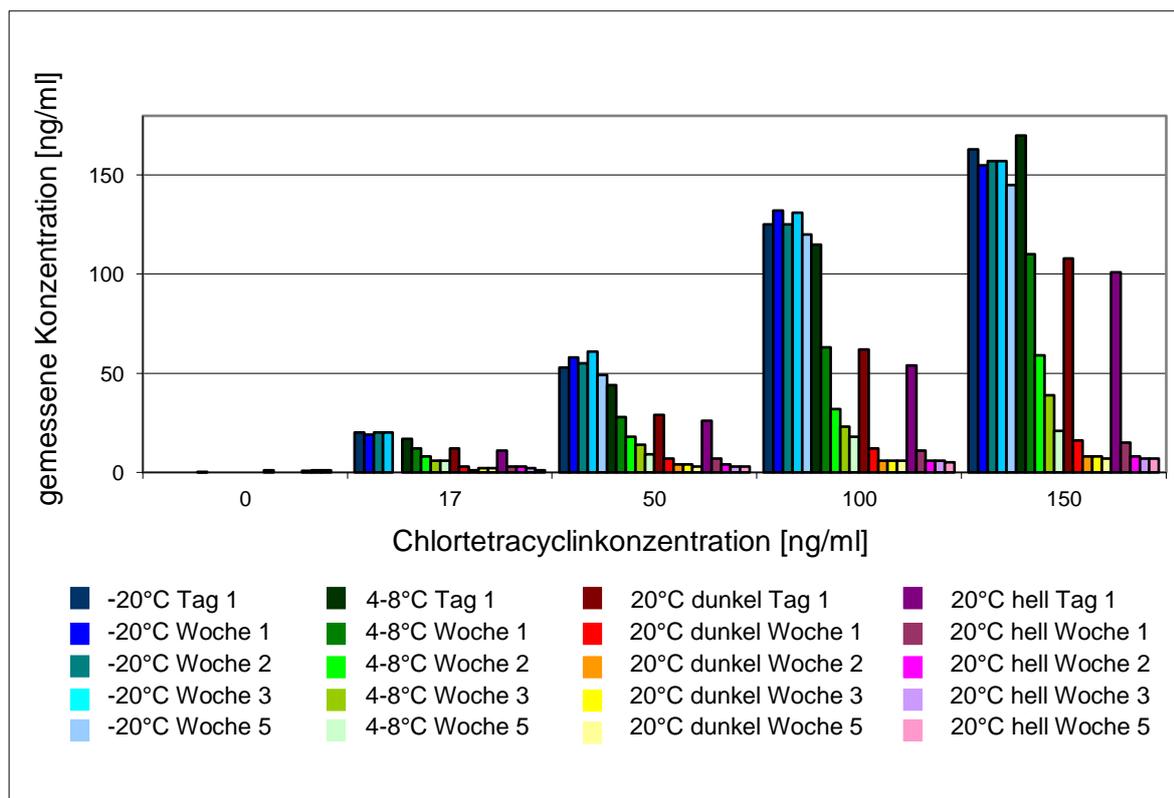


Abbildung 6-17: Ergebnis der Lagerstudie der verdünnten Stammlösungen in Probenpuffer (pH 7,4). Es ist der Einfluss der Lagerdauer, der Lagertemperatur und der Lichteinwirkung während der Lagerung dargestellt. Als Blindwert diente Probenpuffer.

Abbildung 6-17 zeigt den Einfluss von Lagerdauer, Lagertemperatur und Lichteinwirkung auf die Lagerung der verdünnten Chlortetracyclinlösungen in Puffer. Wie bei den Stammlösungen haben die Lagertemperatur und die Lagerdauer einen Einfluss auf die Stabilität der Lösungen. Allerdings ist dieser Einfluss wesentlich stärker als bei den Stammlösungen in Reinstwasser. Mit zunehmender Temperatur und Lagerdauer nimmt die Konzentration der Standardlösungen ab.

Auffällig sind die Gehalte für die Chlortetracyclinlösungen, die im Gefrierschrank gelagert wurden. Im Gegensatz zu den anderen Lagerbedingungen wurden bei allen Konzentrationen und zu jeder Lagerdauer Gehalte mit 100 % oder mehr erhalten.

Bei der Versuchsdurchführung gestaltete es sich schwierig, für alle Messungen und alle Lösungen (frisch angesetzte und gelagerte) die genau gleichen Bedingungen zu schaffen. Im Idealfall sollten auch hier alle Lösungen bei Raumtemperatur vor der Messung gleich lange gestanden haben, da Abbau- und Umwandlungsreaktionen bei Raumtemperatur sehr schnell stattfinden. Gerade bei den eingefrorenen Lösungen gestaltete sich dies als schwierig. Sie mussten nicht nur aufgetaut, sondern auch auf Raumtemperatur gebracht werden. Die gelagerten Stammlösungen mussten zudem auf die entsprechende Konzentration verdünnt werden. In dieser Zeit setzen, wenn auch sehr viel langsamer als bei der Referenzkalibrierung, bereits verschiedene Reaktionen ein, die zu einer Epimerisierung oder einem Abbau führen können. Diese Temperaturunterschiede wirken sich auf die Ergebnisse aus. Daher erhält man bei den bei -20°C gelagerten Lösungen Werte von über 100 %. Man kann deshalb davon ausgehen, dass bei einer Lagerung von -20°C unter Lichtausschluss die Reaktionen sehr viel langsamer ablaufen und die Chlortetracyclinlösungen bei dieser Lagerbedingung am stabilsten sind.

Tabelle 6-31: Maximale Abnahme der Konzentration der einzelnen Standardlösungen bei unterschiedlicher Lagertemperatur in Prozent. Die maximale Abnahme der Konzentration wurde in dieser Versuchsreihe bei der letzten Messung nach 5 Wochen erreicht.

Temperatur	Chlortetracyclinkonzentration [ng/ml]			
	17	50	100	150
4-8°C	65%	82%	82%	86%
20°C dunkel	88%	94%	94%	95%
20°C hell	94%	94%	95%	95%

Bei den verdünnten Lösungen liegt die Abnahme der Chlortetracyclinkonzentration in Puffer nach fünf Wochen deutlich höher als bei den gelagerten Stammlösungen in Wasser. Die bei Raumtemperatur gelagerten Lösungen zeigen eine Abnahme von 95%. Allerdings ist, wie schon bei den gelagerten Stammlösungen, kein großer Einfluss der Lichteinwirkung auf die Lagerung zu erkennen. Die Lagerung der verdünnten Arbeitslösungen, auch über einen kürzeren Zeitraum, ist nicht möglich.

Während die Stammlösung in Wasser gelagert wurde, wurden die Arbeitslösungen in Probenpuffer gelagert. Vor allem die Anwesenheit von Puffersalzen begünstigt die Epimerisierung. Remmers et al. zeigten, dass die Epimerisierung von Tetracyclin in Puffer

(Citrat oder Phosphat 1 M) 70mal schneller abläuft, als in Wasser [19]. Neben der Epimerisierung kommt es auch zu einer Keto-Enol-Tautomerie zwischen C11a und C12. Das Gleichgewicht der tautomeren Formen hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der Art und Konzentration des Puffers, der Ionenstärke, dem pH-Wert und der Temperatur [130].

Zu beachten ist, dass nur unveränderte Muttersubstanz aber keine Umlagerungsprodukte an TetR binden und in dem vorliegenden Assay detektiert werden können.

6.4.2 Robustheit des Assays in Hinblick auf den verwendeten Laufpuffer

Der verwendete Assay imitiert ein biologisches System und reagiert empfindlich auf Änderungen. Bei Andree erfolgten alle Analysen mit dem kostenintensiven HBS-P-Puffer der Firma Biacore als Laufpuffer [130]. Es sollte überprüft werden, ob auch andere preiswertere HBS-P-Puffer für den Screeningassay verwendet werden können.

Bei dem HBS-P-Puffer von der Firma Biacore handelt es sich um einen „ready to use“ Puffer, das heißt, er muss nicht weiter verdünnt werden, er ist filtriert und entgast und damit sofort einsatzbereit. Das P steht für „Surfactant P 20“. Für die durchgeführte Methode musste allerdings noch 5 mmol/L Magnesiumsulfat zugefügt werden. Der Puffer war wie folgt deklariert:

- filtered, degassed
- 0,01 M HEPES, pH 7,4
- 0,15 M NaCl
- 0,005 % Surfactant P20

Gemäß diesen Angaben wurde ein HBS-Puffer angesetzt. Anschließend wurde der Puffer filtriert und entgast. Die genaue Beschreibung der Herstellung steht in Kapitel 9 Material und Methoden.

Der dritte getestete HBS-Puffer wurde von der Firma XanTec bioanalytics GmbH bezogen. Dieser war wie folgt deklariert (Die angegebenen Konzentrationen gelten nach der noch vom Benutzer durchzuführenden 1:10 Verdünnung):

- 10 x HBST buffer
- 10 mM HEPES

- 150 mM NaCl
- pH 7,4, T 20 Surfactant
- 0,02 % sodium azide

Zusätzlich musste wie bei dem Biacore-Puffer 5 mmol/l Magnesiumsulfat zugefügt werden.

Zur Überprüfung der Stabilität des Systems wurden Messreihen mit der Matrix Niere durchgeführt. Zur Beurteilung wurden die Basislinie und die TetR-Kurve nach den Analysen betrachtet. Wie in Kapitel 6.1 beschrieben, versteht man unter Basislinie die Auftragung des Messpunktes t_1 gegen die Zyklusnummer. An diesem Messpunkt ist der Sensorchip nur mit *tetO* belegt. Durch die Beobachtung dieses Messpunktes über mehrere Zyklen lassen sich Veränderungen an der Chipoberfläche erkennen. Ein Anstieg des Signals über mehrere Zyklen ist ein Hinweis auf eine unzureichende Regeneration. Nimmt das Signal während der Zyklen ab, kann das auf eine Ablösung von *tetO* oder Streptavidin hindeuten. Im Idealfall sollte das Signal konstant bleiben. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass sich auch gegenteilige Effekte überlagern können. Beispielsweise könnte die Chipoberfläche geschädigt werden und gleichzeitig die Regeneration unvollständig sein. Betrachtet man in diesem Fall nur die Basislinie, würde man das nicht erkennen, weil sich die beiden Effekte aufheben und so konstante Werte bei der Basislinie ergeben. Neben der Basislinie wurde auch die TetR-Bindung über mehrere Zyklen betrachtet. Sie ist definiert durch die Differenz an den Messpunkten t_2 und t_1 . Die Auftragung dieser Differenz gegen die Zyklen gibt Aufschluss über den Verlauf der TetR-Bindung und einen möglichen Aktivitätsverlust während der Messreihe.

Bei Verwendung des selbst aus den Einzelreagenzien hergestellten Puffers war auffällig, dass bei der ersten Messreihe nach einer Immobilisierung die Basislinie einen Abfall, die TetR-Kurve hingegen den erwarteten Verlauf zeigt. Bei der zweiten Messreihe wurde bei der Basislinie, als auch bei der TetR-Kurve ein starker Signalabfall beobachtet. Um nur den Einfluss des Puffers auf das System untersuchen zu können, wurden Messreihen ohne Matrix und Tetracyclin durchgeführt. Dazu wurde auf dem Sensorchip in einer Flusszelle direkt vor der Analyse *tetO* immobilisiert und im Anschluss nur Puffer injiziert. Bei diesen Zyklen wurde in der Hauptinjektion statt einer Probe oder einer Standardlösung

Probenpuffer injiziert. Der Probenpuffer wurde aus dem jeweiligen Laufpuffer durch Zusatz von NaCl hergestellt. Bei allen anderen Injektionen wurden die Standardreagenzien injiziert. Diese Zyklen werden im weiteren Verlauf als Pufferzyklen bezeichnet. In Abbildung 6-18 und Abbildung 6-19 sind die Basislinie und die TetR-Kurve der Messreihe mit dem selbsthergestelltem Laufpuffer dargestellt.

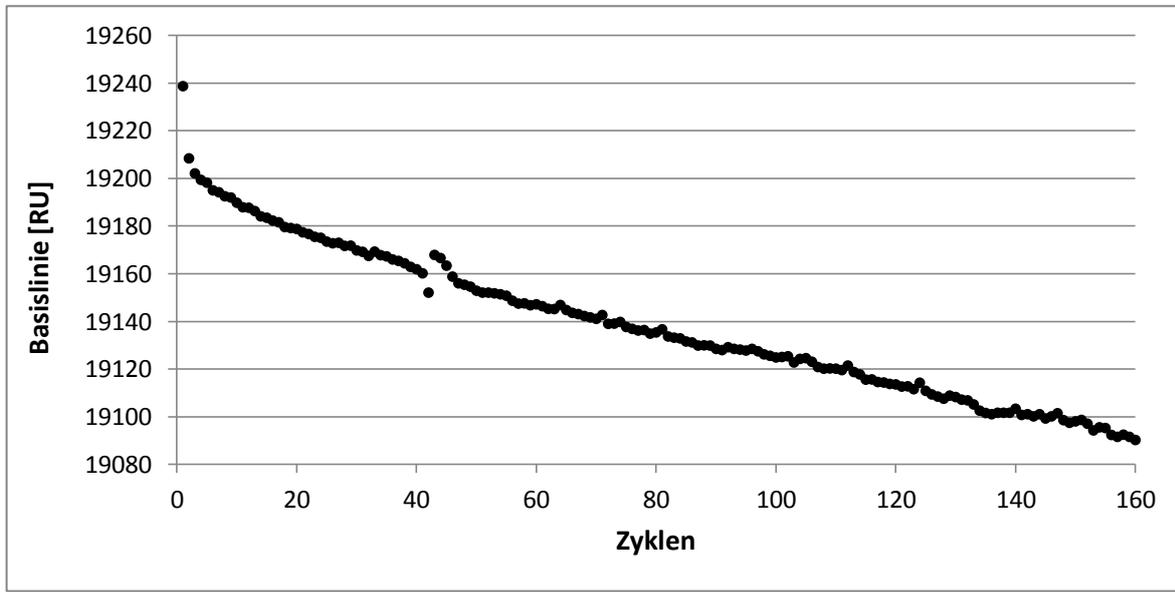


Abbildung 6-18: Verlauf der Basislinie mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 1

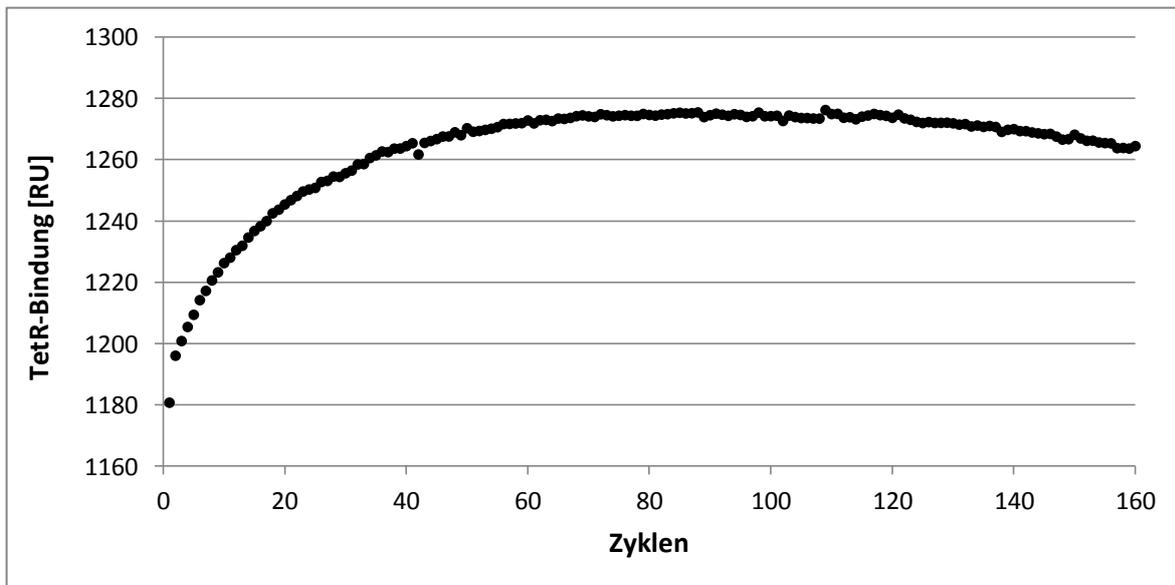


Abbildung 6-19: Verlauf der TetR-Bindung mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 1

Die Basislinie fiel während der gesamten Messreihe konstant ab. Ein Abfall der Basislinie bei einem frisch immobilisierten Chip ist am Anfang der Messreihe typisch. Die ersten Zyklen dienen der Konditionierung des frisch immobilisierten Sensorchips. Nach der Konditionierung sollte die Basislinie konstante Werte annehmen. Die TetR-Bindung hingegen zeigte einen typischen Verlauf und steigt zunächst an. Dieser Anstieg ist am Anfang von Messreihen am deutlichsten und bei frisch immobilisierten Sensorchips am höchsten. Bei einer hohen Zyklenzahl werden die Werte der TetR-Bindung konstant.

Direkt im Anschluss wurde eine weitere Messreihe mit 100 Pufferzyklen durchgeführt. In Abbildung 6-20 und Abbildung 6-21 sind Basislinie und TetR-Kurve dieser Messreihe dargestellt.

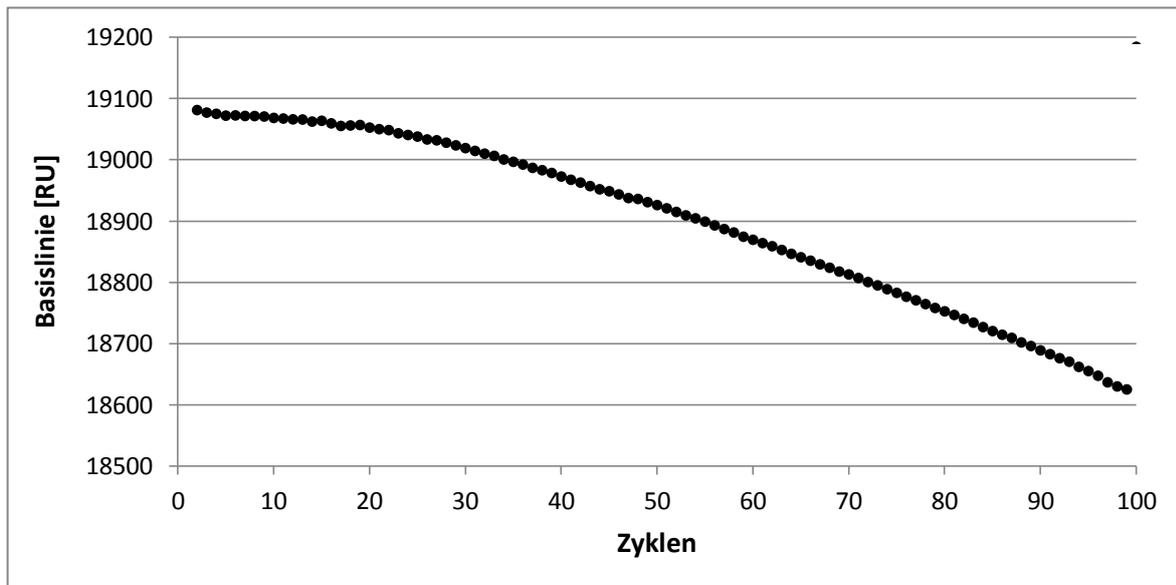


Abbildung 6-20: Verlauf der Basislinie mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 2

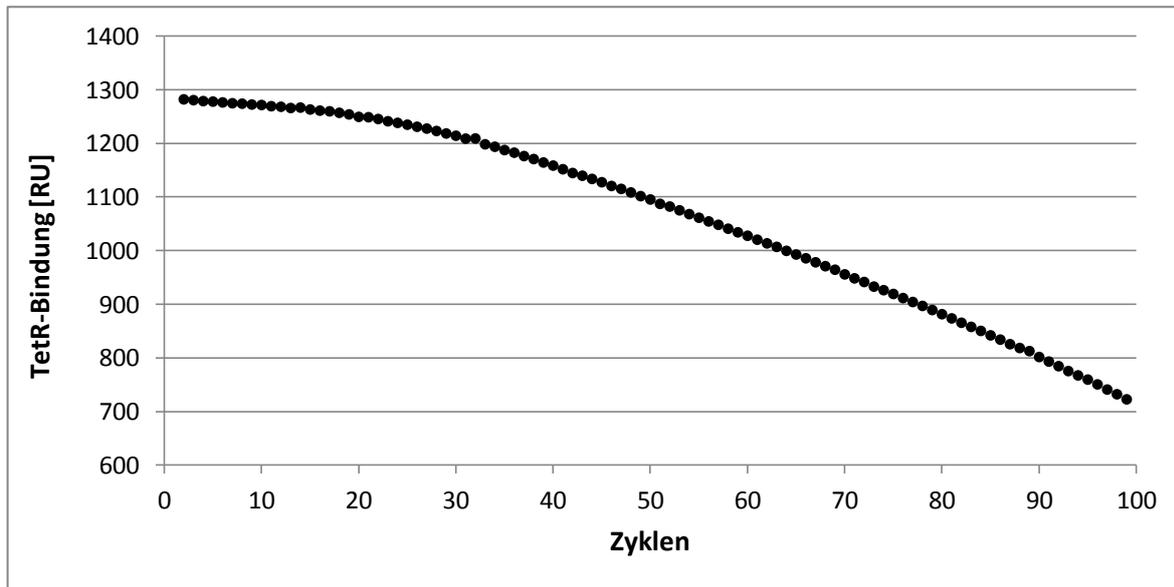


Abbildung 6-21: Verlauf der TetR-Bindung mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 2

Es zeigte sich bei der Basislinie, als auch bei der TetR-Kurve, ein untypisches Bild. Beide wiesen von Anfang an stark abfallende Werte auf. Die abfallende Basislinie deutet auf eine Schädigung der Chipoberfläche hin. Es könnte zu einer Ablösung oder Konformationsänderung von *tetO* gekommen sein. Auch eine Ablösung oder ein Abbau des Streptavidins kommt in Frage. Bei beiden Auftragungen beträgt die Differenz zwischen Anfang und Ende der Messreihe ca. 500 RU. Das verwendete System ist mit dem selbsthergestelltem Puffer nicht stabil.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurden „Pufferzyklen“ mit den kommerziellen Fertig-Puffern von Biacore und XanTec durchgeführt. Nach der Beladung einer Flusszelle mit *tetO* wurde eine Messreihe mit 100 Pufferzyklen gestartet. Im Anschluss wurde eine weitere Messreihe mit demselben Puffer gemessen (50 Zyklen), um die Stabilität des Systems zu überprüfen. In einer dritten Messreihe wurden weitere 100 Pufferzyklen mit dem selbsthergestelltem Puffer durchgeführt. So sollte überprüft werden, ob bei einem Wechsel des Puffers das System stabil bleibt. Nach jeder Messreihe wurden die Basislinie und die TetR-Bindung betrachtet, um Rückschlüsse auf die Stabilität des Systems zu ziehen.

In Abbildung 6-22 und Abbildung 6-23 sind die Basislinie und die TetR-Bindung dargestellt. Beide zeigten einen typischen Verlauf. Am Anfang der Messreihe erfolgte ein

leichter Abfall der Signale bei der Basislinie. Nach der Konditionierung wurden die Werte konstant. Die TetR-Bindung stieg zunächst an, bevor die Signale konstant blieben.

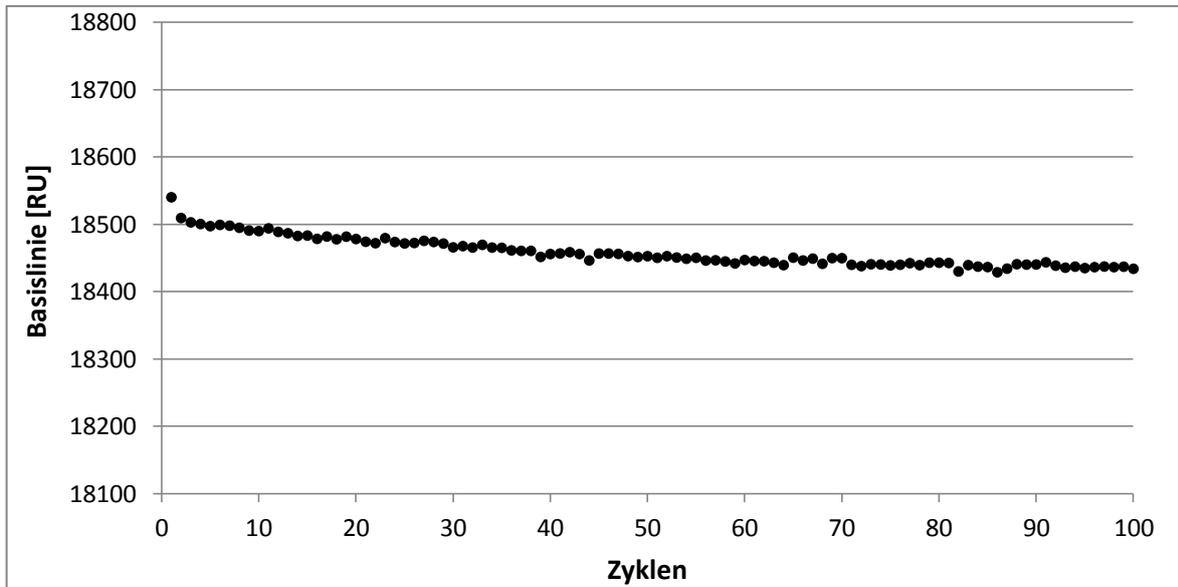


Abbildung 6-22: Verlauf der Basislinie mit Biacore-Puffer, Messreihe 1

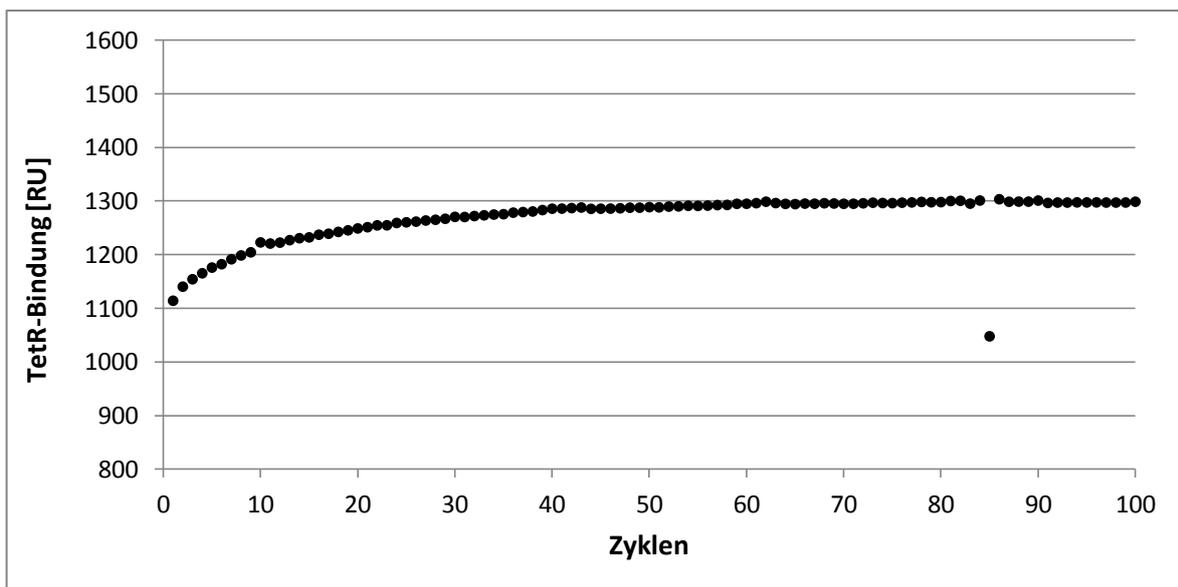


Abbildung 6-23: Verlauf der TetR-Bindung mit Biacore-Puffer, Messreihe 1 (In Zyklus 85 gab es eine Störung im Sensorgramm, daher wurde dort ein abweichender TetR-Wert erhalten.)

Da bei der zweiten Messreihe mit dem selbsthergestellten Puffer ein starker Abfall der Basislinie und der TetR-Bindung beobachtet wurden, erfolgte eine zweite Messreihe mit dem Biacore-Puffer.

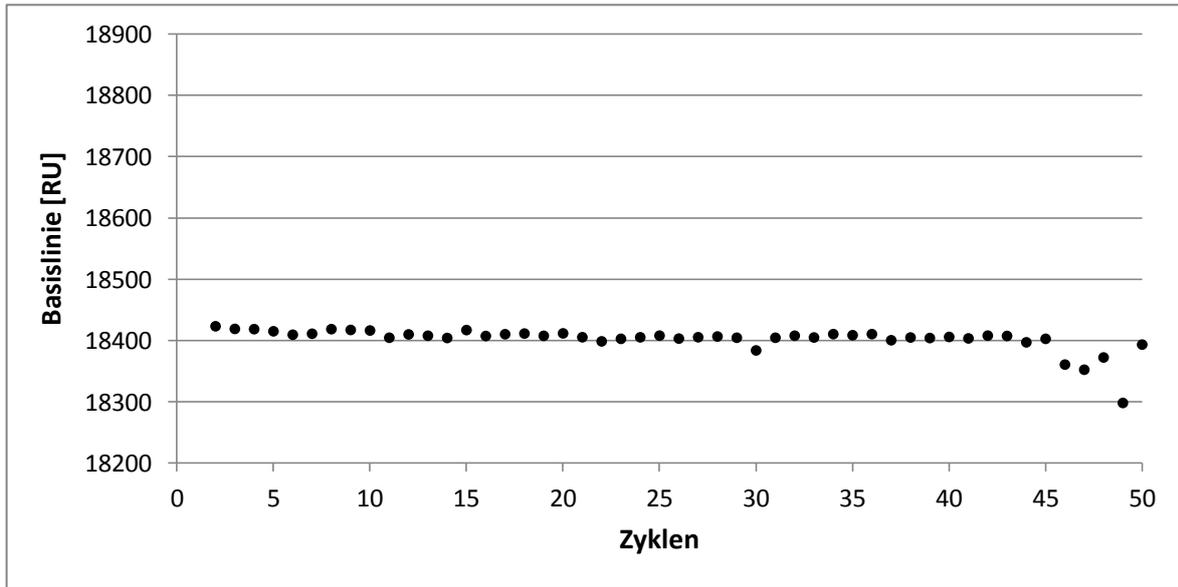


Abbildung 6-24: Verlauf der Basislinie mit Biacore-Puffer, Messreihe 2

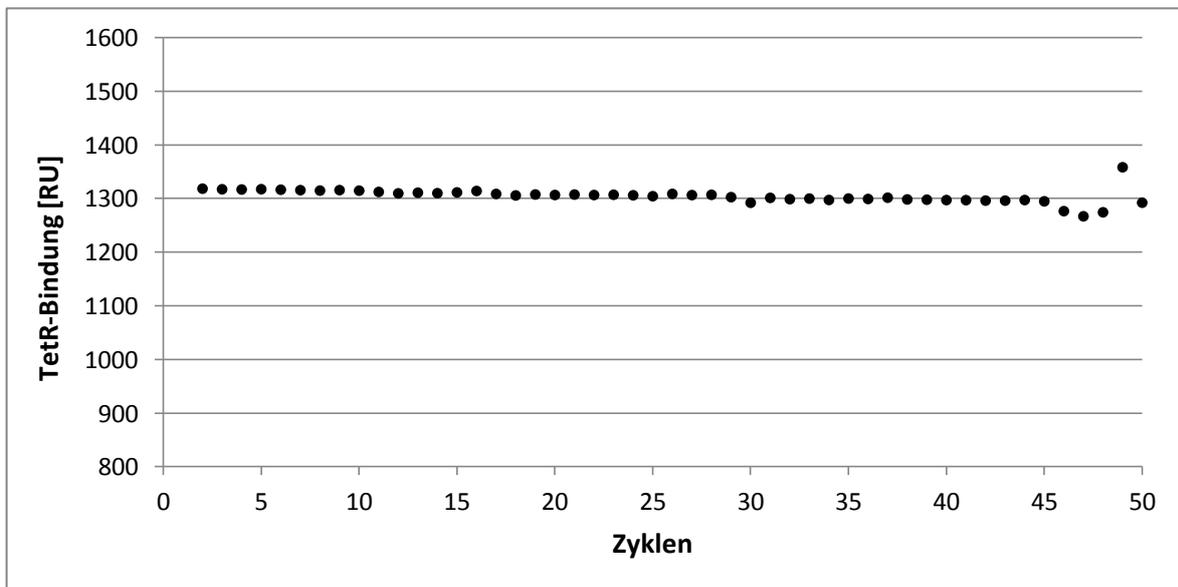


Abbildung 6-25: Verlauf der TetR-Bindung mit Biacore-Puffer, Messreihe 2

Bei der zweiten Messreihe mit dem Biacore-Puffer blieben die Signale für die Basislinie und die TetR-Bindung konstant. Das System lief mit dem Biacore-Puffer weiterhin stabil.

Im Anschluss wurde eine weitere Messreihe mit 100 Zyklen mit dem selbsthergestellten Puffer durchgeführt. Die Auftragung der Basislinie und der TetR-Bindung sind in den beiden folgenden Abbildungen dargestellt.

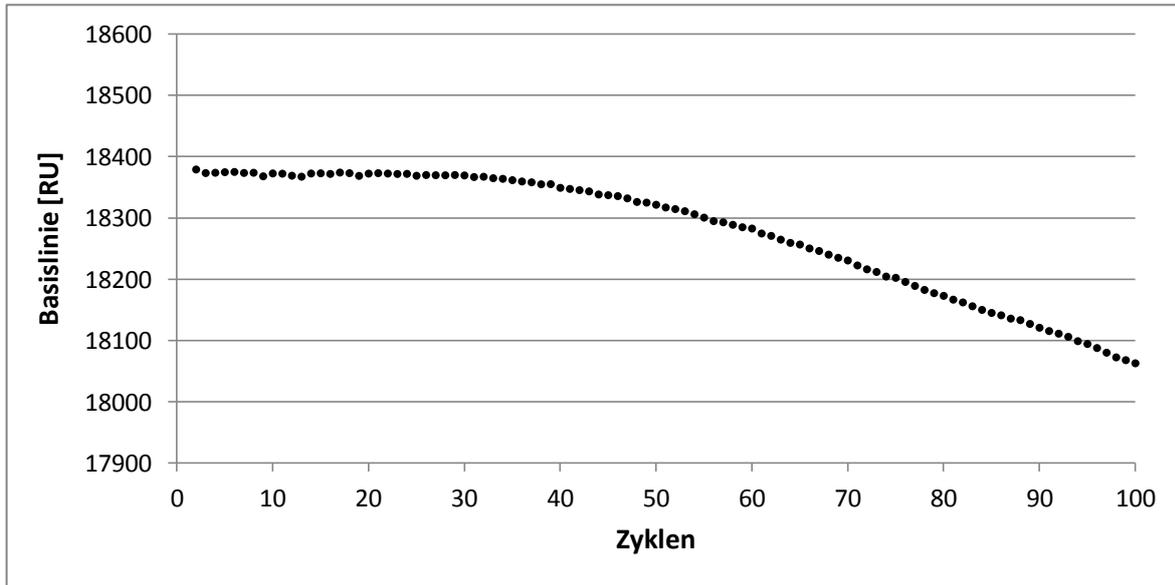


Abbildung 6-26: Verlauf der Basislinie mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 3

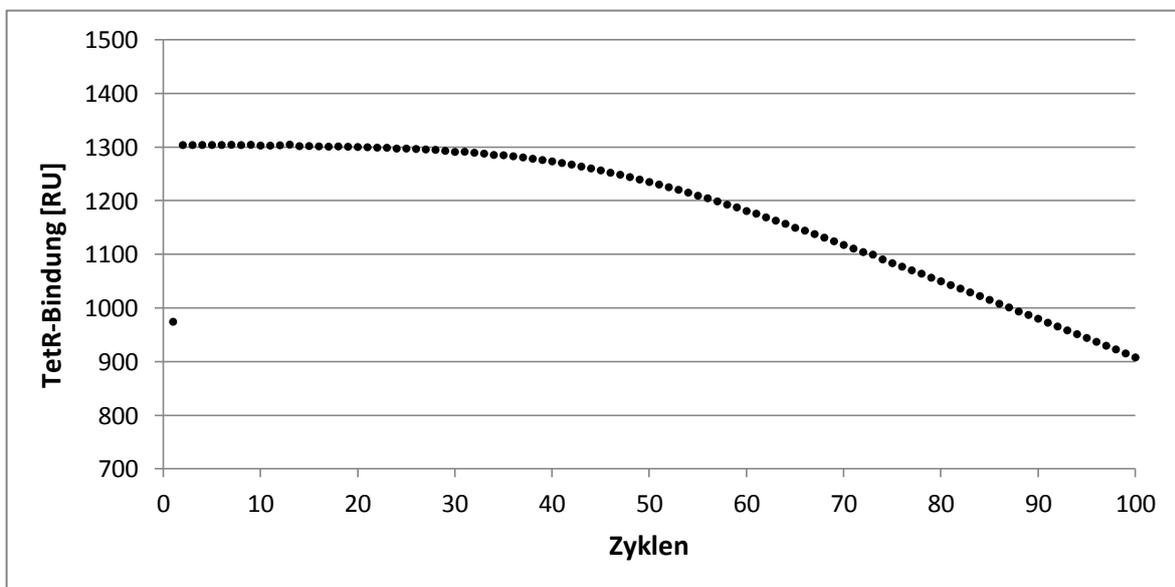


Abbildung 6-27: Verlauf der TetR-Bindung mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 3

Ab Zyklus 30 ist bei beiden Auftragungen ein starker Abfall der Signale zu erkennen. Die Basislinie fällt um ca. 350 RU, die TetR-Bindung um 400 RU. Bei einem Wechsel zu dem selbsthergestelltem Puffer wurde das System instabil. Dies entspricht den Ergebnissen, die zuvor für den selbsthergestellten Puffer erhalten wurden.

Die gleichen Messreihen wurden mit einer frisch mit *tetO* beladenen Flusszelle unter Verwendung des HBS-Puffers der Firma XanTec wiederholt.

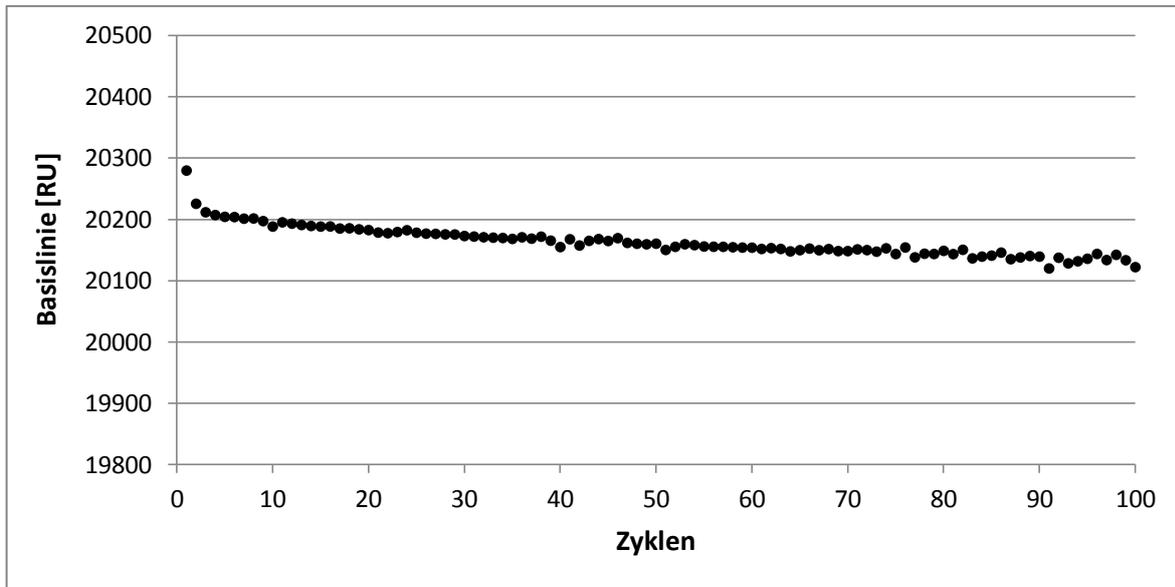


Abbildung 6-28: Verlauf der Basislinie mit XanTec-Puffer, Messreihe 1

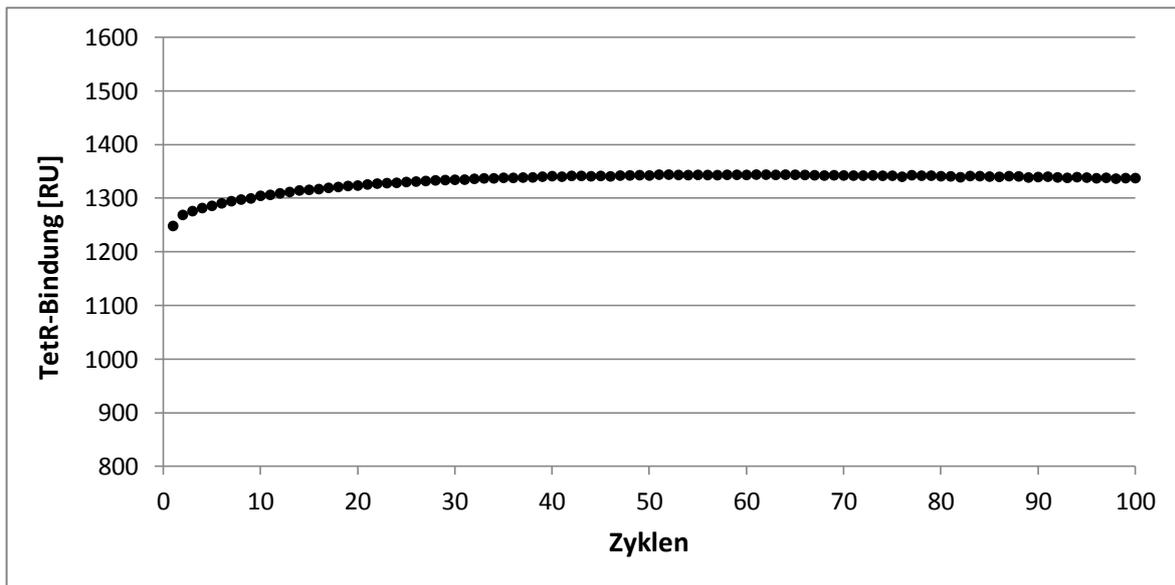


Abbildung 6-29: Verlauf der TetR-Bindung mit XanTec-Puffer, Messreihe 1

Die Basislinie und die TetR-Bindung zeigten mit dem verwendeten XanTec-Puffer einen typischen Verlauf. In Abbildung 6-30 und Abbildung 6-31 ist die nächste Messreihe mit XanTec-Puffer dargestellt.

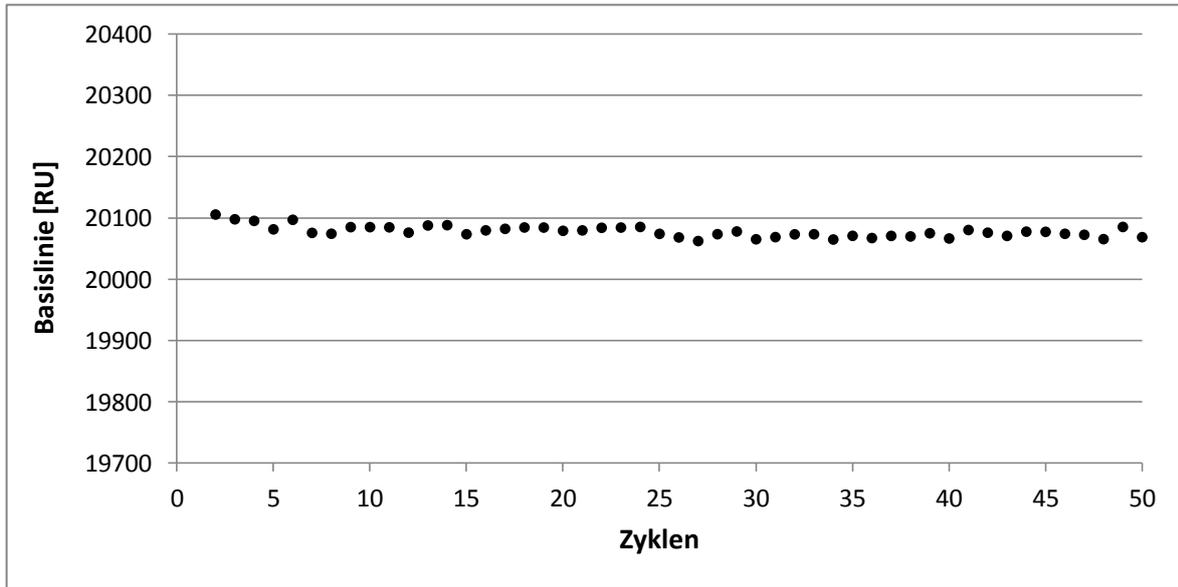


Abbildung 6-30: Verlauf der Basislinie mit Xantec-Puffer, Messreihe 2

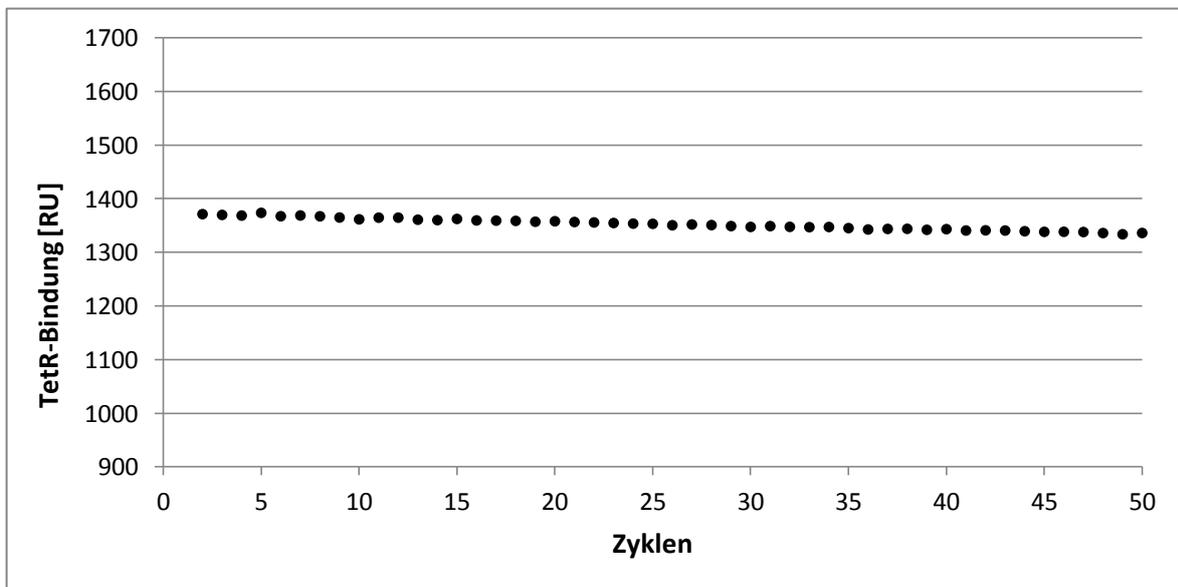


Abbildung 6-31: Verlauf der TetR-Bindung mit XanTec-Puffer, Messreihe 2

Beide Auftragungen zeigten konstante Werte. Wie zuvor bei dem Biacore-Puffer war das System weiterhin stabil. Im Anschluss erfolgten weitere 100 Pufferzyklen mit dem selbsthergestelltem HBS-Puffer. Basislinie und TetR-Bindung dieser Messreihe werden in den folgenden Abbildungen gezeigt.

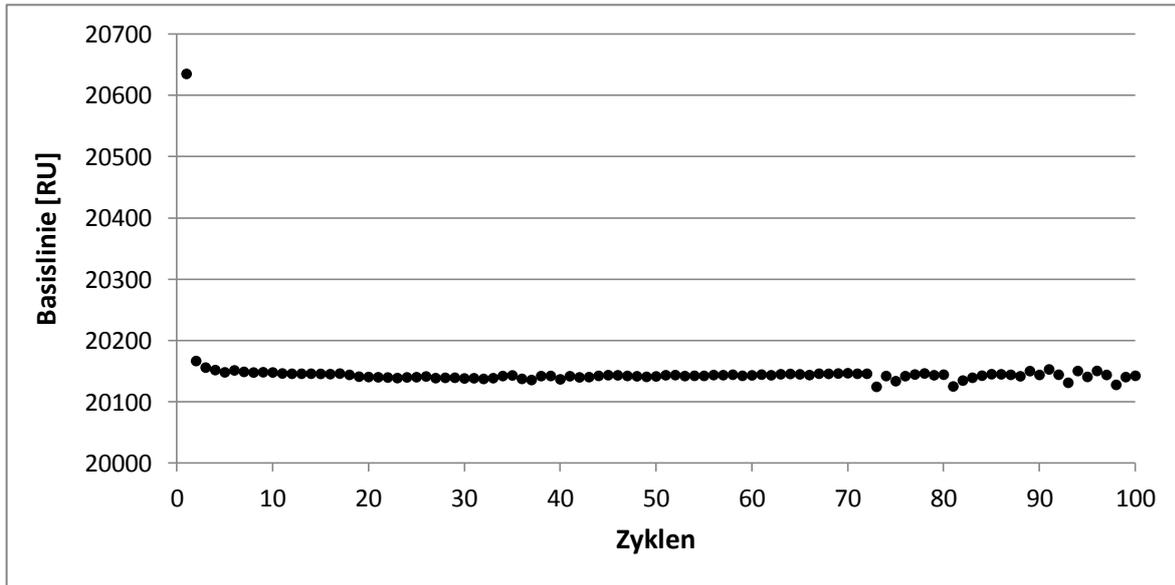


Abbildung 6-32: Verlauf der Basislinie mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 3

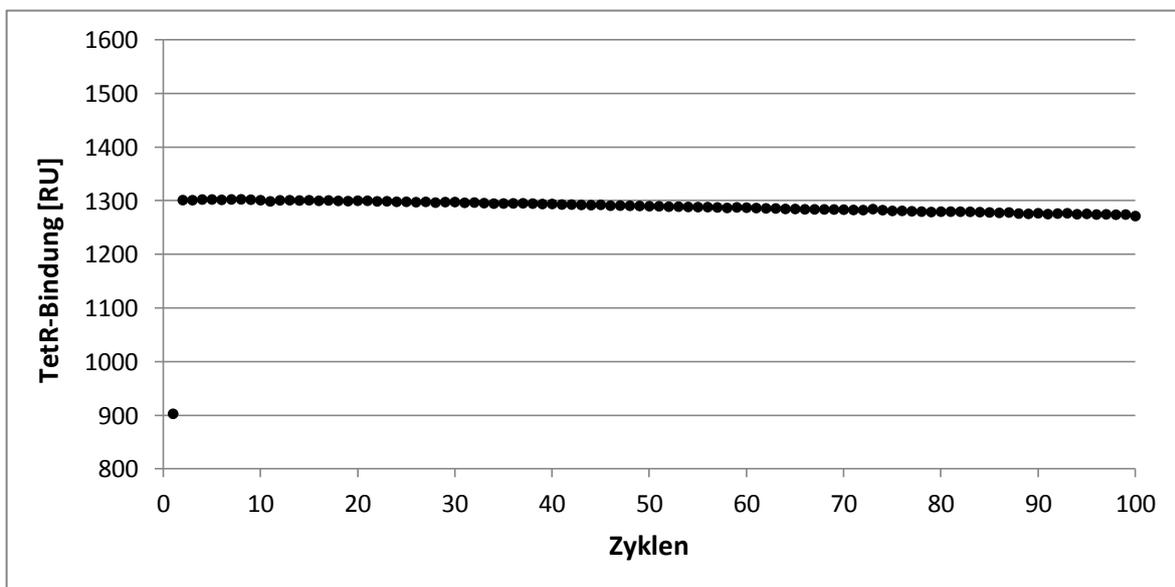


Abbildung 6-33: Verlauf der TetR-Bindung mit selbsthergestelltem Puffer, Messreihe 3

Bei der Umstellung des Systems auf den selbsthergestellten Puffer blieb die Basislinie konstant. Die TetR-Bindung zeigte ab Zyklus 50 im Vergleich zu den Messreihen mit den anderen Puffern nur leicht abfallende Werte. Ein Grund könnte der Zusatz von Natriumazid zu dem XanTec-Puffer sein. Natriumazid dient dazu, das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Eventuell beeinflusst es die Stabilität des Testsystems auch nach dem Wechsel auf den selbsthergestellten Puffer.

Diskussion der Ergebnisse

Bei allen drei getesteten Puffern wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Mit dem selbsthergestellten Puffer wurde das System ab der zweiten Messreihe instabil und ist damit für den Assay nicht geeignet. Bei dem original Biacore-Puffer blieb das System stabil. Nach einem Wechsel auf den selbsthergestellten Puffer kam es allerdings nach 30 Zyklen zu einem starken Signalabfall bei der Basislinie und bei der TetR-Bindung. Das System lief nach der Umstellung nicht mehr stabil. Der XanTec-Puffer hingegen zeigte nach der Umstellung nur einen sehr leichten Abfall bei der TetR-Bindung.

Die unterschiedliche Stabilität des Systems mit den verschiedenen Laufpuffern ist überraschend. Zwar wurde von Andree [130] gezeigt, dass sich Ionenstärke und auch die Art der vorliegenden Ionen in der Messlösung auf das System auswirken, allerdings wurde in dieser Arbeit nur Puffer von Biacore verwendet. Der selbsthergestellte Puffer wurde nach Angaben von Biacore angesetzt. Auch der pH-Wert der Puffer wurde überprüft und eingestellt. Die Hersteller der einzelnen Komponenten des Biacore-Puffers sind nicht bekannt. Da der vorliegende Assay ein biologisches System imitiert, können schon kleine Unterschiede zu Störungen führen. Die Stabilität des Systems mit dem XanTec-Puffer könnte mit dem zugesetzten Natriumazid zusammenhängen, die auch nach dem Wechsel des Puffers beibehalten wird. Möglich wäre auch ein Zusatz zur Haltbarmachung bei dem Biacore-Puffer, der nicht deklariert ist. Zudem sind keine genaueren Angaben zu Filtration und Entgasung der gekauften Puffer bekannt. Alle diese Einflüsse könnten sich auf das System auswirken, so dass an dieser Stelle die Instabilität des Systems nicht abschließend geklärt werden kann.

Es kann festgehalten werden, dass der Laufpuffer einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität des Systems hat, die beiden getesteten kommerziell erhältlichen Produkte sind ohne Probleme einsetzbar, während der selbsthergestellte Puffer für diesen Biosensorassay nicht geeignet war.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der von Möller [129] entwickelte Screeningtest zum Nachweis von Tetracyclinrückständen in Milch und Honig auf eine weitere tierische Matrix übertragen. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Matrix Niere, da Nieren ein wichtiges Ausscheidungsorgan für Fremdstoffe und Antibiotika, wie Tetracycline sind. Daher haben Nieren als Probenmaterial auch eine besondere Bedeutung im Nationalen Rückstandskontrollplan. Zudem wurden Lagerstudien zur Stabilität der Lösungen von Chlortetracyclin, als dem empfindlichsten Tetracyclinantibiotikum durchgeführt.

Der von Möller beschriebene und in dieser Arbeit verwendete tetracyclinspezifische Biosensorassay basiert auf der Oberflächenplasmonresonanz (SPR).

Als spezifischer Bindungspartner dient bei diesem Assay der Tet-Repressor (TetR), ein bekanntes Protein aus der Resistenzforschung. Bei tetracyclinresistenten Bakterien reguliert TetR die Expression des Resistenzgens. Der Repressor bindet in Abwesenheit von Tetracyclin an eine kurze DNA-Sequenz, dem *tet*-Operator (*tetO*) und blockiert die Genexpression. Gelangt Tetracyclin in die Bakterienzelle bindet es mit hoher Affinität an TetR und induziert eine Konformationsänderung, die zur Ablösung des Repressorproteins führt und die Expression des Resistenzgens ermöglicht.

Bei dem verwendeten Assayformat wurde der Operator permanent auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Bei jeder Analyse wurde zunächst *tetO* mit dem Repressorprotein TetR beladen. Anschließend erfolgte die Injektion der Probe. Bei einer rückstandspositiven Probe kam es zur Bindung des Tetracyclins an den Repressor und der damit verbundenen Konformationsänderung des Repressors. Die Massenänderung, die sich durch das Ablösen des Repressorproteins TetR von dem Operator ergibt, wurde mittels SPR detektiert. Dabei war das Messsignal direkt proportional zu der Tetracyclinkonzentration in der Probe.

In den zuvor durchgeführten Arbeiten von Möller und Andree konnte gezeigt werden, dass sich der Biosensorassay für den Nachweis von Tetracyclinrückständen in Honig und Milch eignet [129, 130]. Dabei war zur Vermeidung von Matrixinterferenzen eine Verdünnung der Probe mit Puffer hinreichend. Für die Übertragung des Testsystems auf andere

tierische Matrices, wie Niere, musste eine erweiterte Probenaufarbeitung entwickelt werden. Die höheren Eiweiß- und Fettgehalte führten zu erheblichen Matrixinterferenzen bei der Messung. Da der Assay ein biologisches System imitiert, welches nur unter physiologischen Bedingungen abläuft, führte dies zu Einschränkungen bei den Aufarbeitungsmethoden. Verschiedene systemverträgliche Möglichkeiten zur Probenaufarbeitung wurden untersucht.

Die Gewinnung von Nierenflüssigkeit durch direkte Zentrifugation ohne Zusatz von Puffer war nicht möglich, da nicht genügend Flüssigkeit erhalten wurde. Eine Aufarbeitung mit Puffer und eine anschließende Filtration reichten nicht aus, um Matrixstörungen zu unterbinden. Eine Ultrafiltration der Probe erwies sich schließlich als sehr gut geeignet, um Makromoleküle, wie Proteine, die unspezifisch an der Sensoroberfläche binden, abzutrennen.

Die Hydrolyse der Nierenproteine mit der bakteriellen unspezifischen Protease Subtilisin eignete sich als Probenaufarbeitung nicht, da die Wiederfindung von Tetracyclin sehr niedrig ausfiel.

Eine Homogenisierung des Nierengewebes mit Moulinette und Ultra-Turrax und anschließender Ultrazentrifugation führte zwar zu guten Wiederfindungen und einer guten Reproduzierbarkeit, allerdings ist die Aufarbeitung sehr zeitaufwendig und daher für die Routineanalytik nicht geeignet. Nach jeder Probe müssen Moulinette und Ultra-Turrax, die zur Homogenisierung der Proben eingesetzt wurden, aufwendig gereinigt werden, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Eine Pufferextraktion des Nierengewebes mit dem Stomacher erwies sich als einfache, schnelle und geeignete Methode. Bei einem Stomacher handelt es sich um einen Homogenisator der nach dem „Paddle-Prinzip“ funktioniert. Die vorzerkleinerte Gewebeprobe wird in einen Stomacherbeutel gegeben, mit einem geeigneten Extraktionspuffer versetzt und in den Stomacher eingesetzt. Durch die pulsierende Bewegung der beiden „Paddle“ wird die Probe im Beutel homogenisiert.

Für die erarbeitete Methode wurden die Nierenproben in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 2 cm geschnitten und in einen Stomacherbeutel eingewogen. Nach der Zugabe des Extraktionspuffers wurde die Probe bei 230 upm zwei Minuten im Stomacher

homogenisiert. Im Anschluss wurden 2 ml der Probe zentrifugiert und der erhaltene Überstand ultrafiltriert. Das farblose Filtrat wurde zur SPR-Analyse eingesetzt. Bei dieser Methode wird für jede Probe ein neuer Beutel verwendet, es sind keine zeitaufwendigen Reinigungsschritte der einzelnen Geräte nötig.

Es konnten alle vier für lebensmittelliefernde Tiere in der EU zugelassenen Tetracycline Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin am halben MRL in der Matrix Niere nachgewiesen werden. Die Methode wurde für vier verschiedene Tierarten eingesetzt. Es wurden Nieren vom Schwein, Rind, Kalb und Lamm untersucht. Bei allen Tierarten war der Nachweis von Tetracyclin ohne störende Matrixinterferenzen möglich. Die Eignung des Verfahrens in der Praxis konnte mit 14 realen Nierenproben, die vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Verfügung gestellt wurden, gezeigt werden. Es wurden Nieren vom Schwein, Rind, Kalb und Kuh als Proben erhalten. Bei allen Proben, unabhängig von Tierart und Tetracyclin (Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin oder Doxycyclin), waren die enthaltenen Rückstände auch unterhalb des MRL zuverlässig nachweisbar. Es wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse erhalten.

Die quantitative Auswertung ist wegen des unterschiedlichen Ansprechverhaltens der Tetracycline nur dann möglich, wenn bekannt ist, welches Tetracyclin zum Einsatz gekommen ist, wie z.B. in Eliminationsstudien. Eine weitere Schwierigkeit liegt an dem schnellen Abbau des Chlortetracyclins. In der Lagerstudie, die an die Vorgaben der EU-Entscheidung 2002/657 angelehnt war, konnte gezeigt werden, dass es einer Lagerung von mindestens -20°C bedarf, damit Chlortetracyclinlösungen innerhalb von 35 Tagen nicht abgebaut werden. Höhere Temperaturen ($4 - 20^{\circ}\text{C}$) führten zu einem raschen Abbau.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der eingesetzte Laufpuffer einen erheblichen Einfluss auf die Robustheit des verwendeten Testsystems hat.

8. Ausblick

Über eine Probenaufarbeitung mit dem Stomacher ist man in der Lage, Matrixstörungen bei Niere als Ausgangsmaterial zu beseitigen, so dass alle vier in der EU für lebensmittelliefernde Tiere zugelassenen Tetracycline (Chlortetracyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin) bis weit unterhalb der Höchstmengenkonzentration nachgewiesen werden konnten. Damit erweist sich der Biosensorassay als geeigneter Screeningtest für die Matrix Niere vor einem chemisch-physikalischen Bestätigungsverfahren wie der LC-MS/MS.

Für eine kommerzielle Nutzung des Assays müsste die Anwendung auf weitere Matrices wie Leber und Muskelfleisch übertragen werden. Auch hierfür sind Höchstmengen festgesetzt. Für Leber liegt die zulässige Höchstmenge bei 300 µg/kg und für Muskelfleisch bei 100 µg/kg für die Summe aus Muttersubstanz und Epimer. Auch Untersuchungen von Aquakulturen (Fische, Garnelen), Geflügel und Eiern sind von Interesse.

Um zu klären, ob die Probenaufarbeitung auch für die anderen Matrices geeignet ist, müsste eine Analyse von gewachsenen Rückständen in diesen Matrices erfolgen. Muskelfleisch ist von der Gewebestruktur her fester als Niere. Dies könnte bei der Homogenisierung mit dem Stomacher zu Problemen führen. In diesem Fall müsste das Verfahren zur Homogenisierung und Extraktion geändert werden.

Der MRL für Muskelfleisch liegt mit 100 µg/kg um das Sechsfache niedriger als bei der Matrix Niere, daher müsste geprüft werden, ob der Assay in Verbindung mit der durchgeführten Probenaufarbeitung empfindlich genug ist, Tetracyclinrückstände am MRL noch eindeutig nachzuweisen.

Weitere Möglichkeiten zur Extraktion der Proben wären eine Schüttelextraktion oder eine Ultraschalleextraktion. Bei der Schüttelextraktion wird die Probe mit einer definierten Lösemittelmenge versetzt und damit über eine gewisse Zeit in einem Schüttler behandelt.

Zur Entfernung störender Matrixbestandteile, die die SPR-Messung durch unspezifische Bindung an der Sensorchipoberfläche stören, könnte auch eine Aufreinigung der Probe mittels Festphasenextraktion getestet werden.

9. Material und Methoden

9.1 Herstellung *tet*-Operator

Die DNA-Einzelstränge zur Herstellung des *tet*-Operator wurden als Lyophilisat von der Firma MWG Biotech bezogen. Dazu wurde die 48 Basenpaare enthaltene Sequenz des *tetO1* und ein dazu komplementärer Strang verwendet. In Literatur [132] ist Sequenz des *tetO1* beschrieben:

5'-CCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCATCT-3'

Der 18 Basen lange palindrome Bereich des *tetO1*, in dessen Symmetriezentrum ein T steht, ist hervorgehoben. Über diesen Bereich ist es möglich, dass der Operator-Strang mit einem weiteren Einzelstrang einen Doppelstrang, und damit einen funktionsfähigen Operator, bildet.

Die DNA-Einzelstränge wurden in sterilem Tris-Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L EDTA; pH 7,4) auf 100 µmol/L verdünnt und unter sterilen Bedingungen gemischt. Das Annealing der Oligonukleotide erfolgte in Anlehnung an Literatur [131].

In Tabelle 9-1 sind die Mischungsverhältnisse der Oligonukleotide angegeben, die zur Herstellung der *tetO*-Variante „1x Biotin“ benötigt werden. Dabei wird mit „*tetO*“, dass underivatisierte Oligonukleotid mit der zuvor beschriebenen Sequenz bezeichnet und mit *tetO* Biotin das am 5'-Ende biotinylierte Oligonukleotid mit derselben Sequenz.

Tabelle 9-1: Mischungsverhältnis der zur Herstellung der *tetO*-Variante "1x Biotin" benötigten Oligonukleotide.

<i>tetO</i> -Variante	Oligonukleotide	Volumen [µl]
„1x Biotin“	<i>tetO</i> Biotin	5
	<i>tetO</i>	45

Das anschließende Annealing erfolgte in einem PCR-Thermocycler (Biometra® Personal Cycler, Biometra, Göttingen). Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

Tabelle 9-2: Temperaturführung während des Annealings

Temperatur [°C]	Zeit [min]
97	7
93	5
90	5
86	5
83	5
.	.
.	.
.	.
20	5
-3	Ende

Der Operator wurde im Anschluss bei -20 °C gelagert.

9.2 SPR-Analyse

Geräte und Materialien

Analysenwaage Modell 1712MP8 (Sartorius, Göttingen)

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q Gradient A10; Millipore GmbH, Schwalbach)

Autosamplergefäße (Biacore, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien und Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Membranfilter OE 67; Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 50 mm, Celluloseacetat (Whatman®, General Electric Company, Fairfield, USA)

Mikrotiterplatten (Biacore International AB, Uppsala, Schweden und Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Präzisionswaage Modell TE1502S (Sartorius, Göttingen)

Sensorchips SA mit Streptavidin-Oberfläche (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Schüttler Vortex-Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

SPR-Gerät Biacore Q[®] (Biacore International AB, Uppsala, Schweden, heute GE)

Stomacher[®] 400 Classic Lab Blender und Strainer Bags (Seward Limited, West Sussex, England)

Ultrafiltrationseinheiten Amicon[®] Ultra-4, MWCO 3 kDa, regenerierte Cellulose (Millipore GmbH, Schwalbach)

Ultrafiltrationseinheiten Sartorius Vivaspin 4, MWCO 5 kDa, Polyethersulfon (PES), (Sartorius AG, Göttingen)

ULTRA-TURRAX[®] Modell TP 18/10, (IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Staufen)

Vakuumpumpe Typ EKF56CX-4 (Greifenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz)

Wasserbad Julabo SW1, Temperiereinheit Julabo VC (Julabo Labortechnik, Seelbach)

Zentrifuge (Hermle Z200 A mit Rotor 220.96 V01, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Lösungen und Reagenzien

1 M NaCl in 50 mM NaOH

Chlortetracyclin-HCl (Fluka, Seelze)

Doxycyclin-HCl · ½ H₂O · ½ Ethanol (Fluka, Seelze)

HBS-Puffer + T20 surfactant stock solution (10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, 150 mM NaCl, 0,005 % Surfactant T20, 0,02 % Natriumazid pH 7,4) (XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf)

HBS-P-Puffer (10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, 150 mM NaCl, 0,005 % Surfactant P-20; pH 7,4) (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

HEPES (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Laufpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/l MgSO₄)

MgSO₄ · 7 H₂O (Merck KGaA, Darmstadt)

NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Oxytetracyclin-HCl (Fluka, Seelze)

Probenpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/l MgSO₄ und 35 mmol/l NaCl)

SDS (Natriumdodecylsulfat) (Fluka, Seelze)

Subtilisin A, Typ VIII (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Tetracyclin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Software

Die Steuerung des SPR-Gerätes Biacore Q[®] und die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software Biacore Q Control Software, Version 3.0.3. Für die Auswertung und Quantifizierung der erhaltenen Daten stand die Biacore Evaluation Software, Version 1.0 zur Verfügung.

9.2.1 Präparation der Streptavidin-Sensorchips

Um die Sensorchips für SPR-Messungen verwenden zu können, wird zunächst der Operator an der Chipoberfläche immobilisiert. Für diese Arbeit wurden Streptavidin-Sensorchips verwendet. Bei diesen Chips ist an der Carboxymethyldextranoberfläche Streptavidin gebunden. Die Immobilisierung des biotinylierten *tetO*-Fragmentes erfolgt über die Bindung von Streptavidin und Biotin. In Tabelle 9-3 ist das Injektionsprotokoll der Immobilisierung angegeben.

Tabelle 9-3 Injektionsprotokoll für die Immobilisierung von *tetO* auf dem SA-Chip

Lösung	Injektionsvolumen
1 mol/l NaCl in 50 mm NaOH	3 x 5 µl
Laufpuffer	5 µl
Operator-Lösung (20 nmol/l)	92 µl
0,3% SDS in Laufpuffer	5 µl
Laufpuffer	2 x 5 µl

Im ersten Schritt erfolgte nach Herstellerangaben dreimal eine jeweils einminütige Injektion von 1 mol/l NaCl in 50 mmol/l NaOH. Diese drei Injektionen dienen dazu, die für die Lagerung aufgebrauchten Stabilisatoren zu entfernen. Im Anschluss erfolgte für eine Minute eine Injektion von Laufpuffer, um die NaCl/NaOH-Lösung vollständig zu entfernen. Die Operator-Lösung wurde vor der Injektion auf 20 nmol/l in Laufpuffer verdünnt und mit einer Flussrate von 4 µl/min injiziert. Das Injektionsvolumen richtete sich nach dem gewünschten Immobilisierungslevel. Standardmäßig wurden 92 µl injiziert, was zu einem Immobilisierungslevel von etwa 1400 RU führte. Anschließend wurde der Chip mit 0,3% SDS in Laufpuffer und 2 x mit Laufpuffer für je 1 Minute gespült, um nicht gebundenes *tetO* von der Chipoberfläche zu entfernen.

Alle Injektionen mit Ausnahme der Operator-Lösung erfolgten bei einer Flussrate von 5 µl/min.

9.2.2 Belegung des immobilisierten Operators mit TetR

Die TetR-Stammlösung wurde von Andree in Zusammenarbeit mit der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg hergestellt und stand für diese Arbeit zur Verfügung. Die Stammlösung wurde in Aliquots von 100 µl bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Belegung des Operators mit TetR(BD) wurde eine 1 µmol/l Lösung verwendet. Diese wurde vor jeder Messreihe frisch in Laufpuffer angesetzt und für 30 Sekunden bei einem Fluss von 10 µl/min injiziert. Die aufgetauten Aliquots wurden bei 4 – 8°C weiter aufbewahrt.

9.2.3 Regeneration der Chipoberfläche

Bei der Regeneration werden verbliebenes TetR und unspezifisch gebundene Matrixbestandteile von der Chipoberfläche entfernt. Dazu wurden 5 µl SDS (0,3% w/v in Laufpuffer) mit einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Da sich SDS in der Carboxymethyldextranschicht des Chips einlagert, erfolgte im Anschluss eine Injektion von 20µl Probenpuffer (Flussrate von 20 µl/min), um das SDS schneller aus der Chipmatrix auszuwaschen. Anschließend wurde ein weiterer Waschschriff des Injektionssystems durchgeführt („extra wash“) und es folgte eine Stabilisierungszeit von 60 Sekunden bis zum nächsten Zyklus.

9.2.4 Lagerung der mit *tetO* belegten Sensorchips

Die Lagerung der belegten Sensorchips erfolgte außerhalb des SPR-Gerätes. Dazu wurde der Sensorchip nach einer Messreihe ausgebaut und aus seiner Schutzkassette geschoben. Mit Hilfe einer Kolbenhubpipette wurden 6 µl 1 µmol/L TetR in Laufpuffer auf die Sensorchipoberfläche gegeben und unter Stickstoff getrocknet. Anschließend wurde der Sensorchip mit Schutzkassette in einem mit etwas Blaugel gefüllten Greinertube unter Stickstoff im Kühlschrank gelagert.

9.2.5 Herstellung von Kalibrierlösungen und Lösungen zum Dotieren

Zum Aufnehmen von Kalibrierkurven wurden Tetracyclin-Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 bzw. 0,5 mg/ml hergestellt. In Tabelle 9-4 sind die Einwaagen und Volumina der einzelnen Tetracycline aufgeführt.

Tabelle 9-4: Herstellung der Stammlösungen der einzelnen Tetracycline.

Tetracyclin	Konzentration [mg/ml]	Einwaage	Lösungsmittel
Tetracyclin-Hydrochlorid	1	10,8 mg/10 ml	Probenpuffer
Chlortetracyclin-Hydrochlorid	0,5	10,8 mg/20 ml	Reinstwasser
Oxytetracyclin-Hydrochlorid	1	10,8 mg/10 ml	Reinstwasser
Doxycyclin-Hyclat	1	11,5 mg/10 ml	Reinstwasser

Für jede Analysenreihe wurden die Stammlösungen frisch hergestellt. Sie wurden für die Kalibrierkurven mit Probenpuffer auf die entsprechende Konzentration verdünnt (17 – 150 ng/ml bzw. 100 – 900 µg/kg). Für den „Nullwert“ wurde Probenpuffer injiziert.

Für die Dotierung der Proben wurde die Stammlösung mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, dass für die entsprechende Konzentration die Probe mit 100 µl dotiert werden konnte.

Für die physiologische Kochsalzlösung wurde Natriumchlorid (0,9 %) in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Im Anschluss wurde die Lösung membranfiltriert (Whatman, 0,45 µm, Celluloseacetat).

9.2.6 Messung der Lagerstabilität von Chlortetracyclinlösungen

Bei der Messung der Lagerstabilität wurden die Stammlösung und verdünnten Lösungen (Arbeitslösungen) gemessen. Die Chlortetracyclin-Stammlösung wurde in Reinstwasser angesetzt ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$), für die Arbeitslösungen wurde die Stammlösung mit Probenpuffer auf 17, 50, 100 und 150 ng/ml verdünnt. Alle Lösungen wurden während der Lagerstudie in Greinertubes gelagert. Die Arbeitslösungen konnten direkt gemessen werden. Die Stammlösung wurde mit Probenpuffer auf die entsprechenden Konzentrationen vor der Messung verdünnt. Zusätzlich wurde für den Nullwert der Kalibrierung Probenpuffer gemessen. Die Lösungen wurden gegen am Messtag frisch hergestellte Kalibrierlösungen gemessen.

9.2.7 Herstellung Puffer

Für den selbsthergestellten Laufpuffer wurden 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (10 mM), Natriumchlorid (150 mM) und Magnesiumsulfat (5 mM) in Reinstwasser gelöst. Für den Probenpuffer wurden zusätzlich 35 mM Natriumchlorid eingewogen. Der pH-Wert wurde mit 500 mM NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach einer Membranfiltration (Whatman, 0,45 µm, Celluloseacetat) wurde 0,005 % Tween 20 hinzugefügt und entgast.

9.2.8 Injektionssequenz

In Tabelle 9-5 ist die Injektionssequenz der Messzyklen dargestellt.

Tabelle 9-5: Injektionsfolge der Messzyklen

Injektion von	Injektionsdauer [s]	Flussrate [ml/min]
TetR in Laufpuffer	30	10
Extra wash		
Tetracyclinlösung (Probe oder Standard)	30	10
SDS in Laufpuffer	15	20
Probenpuffer	60	10
Extra wash, Stabilisierungszeit 60 Sekunden		

9.3 Probenaufarbeitung

9.3.1 Stomacher

Die Nieren wurden in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 2 cm geschnitten. Die Dotierung am halben MRL oder am MRL erfolgte durch Auftragen von 100 µl der entsprechenden Tetracyclinlösung auf die Schnittkanten der Probe. Die dotierten Proben wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend in einen Stomacherbeutel eingewogen (16 g). Es wurden 80 g Probenpuffer hinzugegeben und für 2 Minuten mit 230 upm homogenisiert. 2 ml der homogenisierten Probe wurden zentrifugiert (1 h, 4°C, 25000 g) und der Überstand ultrafiltriert (Millipore Amicon Ultra 4, MWCO 3000 Da, regenerierte Cellulose, 6000 g, 15 min). Das farblose Filtrat wurde zur SPR-Analyse eingesetzt.

9.3.2 Enzymatischer Abbau durch Protease

Die Nierenproben wurden in einer Moulinette zerkleinert. Im Anschluss wurden 2 g der Probe mit 5 g Probenpuffer für 1 Minute mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (Stufe 4). Für die Dotierung am MRL wurden 100 µl der entsprechend verdünnten Tetracyclinlösung hinzu gegeben. Nach der Zugabe der Subtilisinlösung (40 µl, 50 mg/ml) erfolgte eine zweistündige Inkubation im Wasserbad bei 50°C. Anschließend erfolgte eine Ultrafiltration (Vivaspin 4, Cut-off: 5000 Da, PES). Das Filtrat wurde zur SPR-Analyse eingesetzt.

9.3.3 Aufarbeitung mit dem Ultra-Turrax

Die Nierenproben wurden in einer Moulinette zerkleinert. 4 g der Probe wurden mit 20 g Probenpuffer für 1 Minute mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Bei den dotierten Proben wurden nach der Einwaage zunächst 100 µl der entsprechenden Tetracyclinlösung hinzugefügt. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten wurde der Puffer eingewogen und homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation der Probelösung (6000 g, 15 Minuten, RT). Der Überstand wurde anschließend ultrazentrifugiert (110000 g, 45 Minuten, 4°C). Nach der Ultrafiltration (Millipore Amicon Ultra 4, MWCO 3000 Da, regenerierte Cellulose, 6000 g, 15 min) erfolgte die SPR-Messung.

10. Abkürzungsverzeichnis

ADI	acceptable daily intake
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
CTC	Chlortetracyclin
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DOX	Doxycyclin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union
HBS-P	HEPES gepufferte Kochsalzlösung mit Surfactant P 20
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IFC	integrated μ -fluidic cartridge
LED	light emitting diode
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
MRL	maximum residue limit
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molecular weight cut off
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
OTC	Oxytetracyclin
PES	Polyethersulfon
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Abkürzungsverzeichnis

RIA	Radioimmunoassay
RP	reversed phase
RU	response units
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPFIA	solid-phase fluorescence immunoassay
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
TC	Tetracyclin
<i>tetO</i>	Gensequenz des Tetracyclin-Operators
TetR	Tetracyclin-Repressor-Protein
upm	Umdrehungen pro Minute

11. Literatur

1. Schwarz, S., Werckenthin, C., *Risiken des Antibiotika- Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*. Chemotherapie Journal. 2001. 10(6): p. 197–202
2. Kietzmann, M., *Sorgsamer und effizienter Umgang mit Tierarzneimitteln - Antibiotikaleitlinien*. <http://www.msztv.de/schw-tag/2001/st01-kie.pdf>. Accessed 13 January 2012
3. *Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung ABl. L 268: 29-43. 2003.*
4. FEDESA. Dtsch Tierärztebl. 1998. 11: p. 1093
5. Michalova, E., Novotna, P., Schlegelova, J., *Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them*. Vet Med - Czech. 2004. 29(3): p. 79–100
6. *Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), zuletzt geändert am 19. Oktober 2012 (BGBl. I S. 2192). 2005.*
7. *Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs ABl. L 15: 1. 2010.*
8. Duggar, B.M., *Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1948. 51(Art. 2): p. 177–81
9. Duggar, B.M., *Aureomycin and preparation of the same*. 1949
10. Finlay, A.C., Kane, J.H., *Terramycin and its production*. 1950
11. Hochstein, F.A., Stephens, C.R., Conover, L.H., Regna, P.P., Pasternack, R., Gordon, P.N., Pilgrim, F.J., Brunings, K.J., Woodward, R.B., *The structure of Terramycin*. J. Am. Chem. Soc. 1953. 75(22): p. 5455–75
12. Stephens, C.R., Conover, L.H., Pasternack, R., Hochstein, F.A., Moreland, W.T., Regna, P.P., Pilgrim, F.J., Brunings, K.J., Woodward, R.B., *The structure of Aureomycin*. J. Am. Chem. Soc. 1954. 76(13): p. 3568–75
13. Conover, L.H., Moreland, W.T., English, A.R., Stephens, C.R., Pilgrim, F.J., *Terramycin XI Tetracycline*. J. Am. Chem. Soc. 1953. 75(18): p. 4622–3
14. Sum, P.E., Sum, F.W., Projan, S.J., *Recent developments in tetracycline antibiotics*. Curr. Pharm. Des. 1998. 4(2): p. 119–32
15. Chopra, I., *New developments in tetracycline antibiotics: glycylicyclines and tetracycline efflux pump inhibitors*. Drug Resist. Updat. 2002. 5(3-4): p. 119–25
16. Dürckheimer, W., *Tetracyclines: chemistry, biochemistry, and structure-activity relations*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1975. 14(11): p. 721–34
17. Mitscher, L.A., Bonacci, A.C., Sokoloski, T.D., *Circular dichroism and solution conformation of the tetracycline antibiotics*. Tetrahedron Lett. 1968(51): p. 5361–4
18. Doerschuk, A.P., Bitler, B.A., McCormick, J.R.D., *Reversible isomerizations in the tetracycline family*. J. Am. Chem. Soc. 1955. 77(17): p. 4687
19. Remmers, E.G., Sieger, G.M., Doerschuk, A.P., *Some observations on the kinetics of the C4-epimerization of tetracycline*. J Pharm Sci. 1963. 52: p. 752–6
20. McCormick, J.R.D., Fox, S.M., Smith, L.L., Bitler, B.A., Reichenthal, J., Origoni, V.E., Muller, W.H., Winterbottom, R., Doerschuk, A.P., *Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines*. J. Am. Chem. Soc. 1957. 79(11): p. 2849–58
21. Mitscher, L.A., *The Chemistry of the Tetracycline*. In: Medicinal Research, G.L. Ed.: Grunewald, Editor. 1978, Marcel Dekker Inc.: New York, vol. 9

22. Hüttenrauch, R., Keiner, J., *Epimerisierung von Mannich-Basen der Tetracyclin-Antibiotika*. Naturwissenschaften. 1966. 53(21): p. 552
23. Hussar, D.A., Niebergall, P.J., Sugita, E.T., Doluisio, J.T., *Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives*. J. Pharm. Pharmacol. 1968. 20(7): p. 539–46
24. Nelson, M., Hillen, W., Greenwald, R.A., *Tetracyclines in biology, chemistry and medicine*. 2001, Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag
25. Qiang, Z., Adams, C., *Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics*. Water Res. 2004. 38(12): p. 2874–90
26. Duarte, H.A., Carvalho, S., Paniago, E.B., Simas, A.M., *Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines*. J Pharm Sci. 1999. 88(1): p. 111–20
27. Oliva, B., Gordon, G., McNicholas, P., Ellestad, G., Chopra, I., *Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 1992. 36(5): p. 913–9
28. Schneider, S., Schmitt, M.O., Brehm, G., Reiher, M., Matousek, P., Towrie, M., *Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg²⁺ and Ca²⁺*. Photochem. Photobiol. Sci. 2003. 2(11): p. 1107–17
29. Gans, E.H., Higuchi, T., *The solubility and complexing properties of oxytetracycline. I. Interaction in aqueous solution*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim). 1957. 46(8): p. 458–66
30. Blackwood, R.K., Hlavka, J.J., Boothe, J.H., *The Tetracyclines*. 1985, Berlin, New York: Springer-Verlag
31. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2001, München, Jena: Urban & Fischer, 8th edition
32. Agwuh, K.N., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006. 58(2): p. 256–65
33. Wang, J., MacNeil, J.D., Kay, J.F., *Chemical analysis of antibiotic residues in food*. 2012, Hoboken, N.J: Wiley & Sons
34. Chopra, I., *Tetracyclines*. In: Finch, R.G., Greenwood, D., Norroby, S.R., Whitley, R.J. (eds.) *Antibiotic and chemotherapy. Anti-infective agents and their use in therapy*, 8th edition, pp. 393–406. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. 2003
35. Kroker, R., *Kompaktwissen Tierarzneimittelrückstände*. 2002, Hamburg: Behr, 1st edn.
36. Zurhelle, G., Petz, M., Müller-Seitz, E., Siewert, E., *Metabolites of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline and Their Distribution in Egg White, Egg Yolk, and Hen Plasma*. J. Agric. Food Chem. 2000. 48(12): p. 6392–6
37. Kennedy, D.G., McCracken, R.J., Carey, M.P., Blanchflower, W.J., Hewitt, S.A., *Iso- and epi-iso-chlortetracycline and the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*. J Chromatogr A. 1998. 812(1-2): p. 327–37
38. Kennedy, D.G., McCracken, R.J., Hewitt, S.A., McEvoy, J.D., *Metabolism of chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg*. Analyst. 1998. 123(12): p. 2443–7
39. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, Zentrum Infektiologie und Reisemedizin, *Germap 2008. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch*. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. 2008, Rheinbach: Antiinfectives Intelligence, 1st edn.

40. *Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information vom 24. Februar 2010 (BGBl. I S. 140), zuletzt geändert am 19. Oktober 2012 (BGBl. I S. 2192)*
41. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).
http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2012/2012_abgabemengenregister/2012_09_11_pi_abgabemengenregister.html?nn=1401276
42. *Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates ABl. L 152: 11. 2009.*
43. *Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2011 (BGBl. I S. 1770), zuletzt geändert am 3. August 2012 (BGBl. I S. 1708). 2011.*
44. *Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG ABl. L 125: 10. 1996.*
45. *Entscheidung 97/747/EG von 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 ABl. L 303: 12–15. 1997.*
46. Schmädicke, I., *Nationaler Rückstandskontrollplan – Stärkung des Verbraucherschutzes durch gezielte Kontrollen bei tierischen Lebensmitteln*. J. Verbr. Lebensm. 2006. 1(1): p. 51–6
47. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).
http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/07_NRKP/01_berichte_nrkp/09_NRKP_ErgaenzendeDokumente_2011/nrkp_bericht_2011_node.html#doc3645770bodyText15
48. Saenger, W., Orth, P., Kisker, C., Hillen, W., Hinrichs, W., *The Tetracycline Repressor-A Paradigm for a Biological Switch*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2000. 39(12): p. 2042–52
49. Roberts, M.C., *Mechanism of resistance for characterized tet and otr genes*.
<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>. 2012
50. Zakeri, B., Wright, G.D., *Chemical biology of tetracycline antibiotics*. Biochem. Cell Biol. 2008. 86(2): p. 124–36
51. Eckert, B., Beck, C.F., *Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell-death and loss of membrane-potential*. J Bacteriol. 1989. 171(6): p. 3557–9
52. Schnappinger, D., Hillen, W., *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*. Arch. Microbiol. 1996. 165(6): p. 359–69
53. Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H., Taylor, D.E., *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*. Antimicrob. Agents Chemother. 2003. 47(12): p. 3675–81
54. Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsch, T., Yonath, A., Franceschi, F.,

- Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3.* EMBO J. 2001. 20(8): p. 1829–39
55. Moore, I.F., Hughes, D.W., Wright, G.D., *Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX.* Biochemistry. 2005. 44(35): p. 11829–35
 56. Yang, W., Moore, I.F., Koteva, K.P., Bareich, D.C., Hughes, D.W., Wright, G.D., *TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics.* J. Biol. Chem. 2004. 279(50): p. 52346–52
 57. Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., *16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium.* Antimicrob. Agents Chemother. 1998. 42(7): p. 1702–5
 58. Schubert, P., Schnappinger, D., Pfeleiderer, K., Hillen, W., *Identification of a stability determinant on the edge of the Tet repressor four-helix bundle dimerization motif.* Biochemistry. 2001. 40(11): p. 3257–63
 59. Orth, P., *Der Regulationsmechanismus des Tetrazyklin-Repressors.* Dissertation, Fachbereich Chemie Freie Universität Berlin, 1998
 60. http://www.rcsb.org/pdb/images/2xpw_bio_r_500.jpg
 61. *Entscheidung 2002/657/EG von der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen vom 12.08.2002, ABI. L 221: 8. 2002.*
 62. Pikkemaat, M.G., *Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals.* Anal Bioanal Chem. 2009. 395(4): p. 893–905
 63. *BVL (Hrsg), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG 01.00-6, Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Agar-Diffusionsverfahren, Blättchentest, Beuth Verlag, Berlin*
 64. *Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung von Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis vom 9. November 2009 (BANz. Nr. 178, S. 4005).2009.*
 65. *Produktinformation BRT-Hemmstofftestsysteme, Analytik in Milch, Produktions- und Vertriebs-GmbH, München, Deutschland, http://www.aim-bayern.de/pdf/BRT_Produktinformation10_2010.pdf*
 66. *Produktinformation CMT - Copan Milk Test, Copan Italia, Brescia, Italien, https://www.globalcube.net/clients/beldico/content/medias/products/6_imp/labo/diagnostics/diary/copan_copan_milk_test.pdf*
 67. *Produktinformation Delvotest, DSM Food Specialities, Delft, Niederlande, http://www.dsm.com/en_US/foodandbeverages/public/home/pages/delvotest.jsp*
 68. *Produktinformation Eclipse, Zeu Inmunotec, Zaragoza, Spanien, <http://www.zeulab.com/product/eclipse-100>*
 69. *Produktinformation Cowside test, Charm Sciences Inc., Lawrence, Massachusetts, USA, <http://www.charm.com/resource/file/87/>*
 70. *Produktinformation Premi-Test, R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland, <http://www.r-biopharm.com/de/news/lebens-futtermittelanalytik/news-premitest>*
 71. *Produktinformation Explorer test, Zeu Inmunotec, Zaragoza, Spanien, <http://www.zeulab.com/product/explorer-2-0>*
 72. *Produktinformation KIS Test, Charm Sciences Inc., Lawrence, Massachusetts, USA, <http://www.charm.com/products/charm-inhibition/kis-kidney-inhibition-swab.html>*
 73. Meyer, M.T., Bumgarner, J.E., Varns, J.L., Daughtridge, J.V., Thurman, E.M., Hostetler, K.A., *Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry.* Sci. Total Environ. 2000. 248(2-3): p. 181–7

74. Kim, S., Chung, H.S., Ha, J.Y., Jung, W.C., Heo, S.H., Lee, H.J., *Application of a solid-phase fluorescence immunoassay to determine oxytetracycline and tetracycline residues in tissue of olive flounder (Paralichthys olivaceus)*. J. Vet. Med. Sci. 2006. 68(11): p. 1243–5
75. Okerman, L., De Wasch, K., Van Hoof, J., Smedts, W., *Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and in porcine kidneys by solid-phase fluorescence immunoassay*. J AOAC Int. 2003. 86(2): p. 236–40
76. *Produktinformation Ridascreen Tetracyclin, r-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland*. www.r-biopharm.com
77. *Produktinformation Charm II, Charm sciences inc., Lawrence, Massachusetts, USA*, <http://www.charm.com/de/products/charm-ii.html>
78. *Produktinformation Tetrasensor, Unisensor diagnostic engineering, Wandre (Liège), Belgien*, <http://www.unisensor.be/en/catalog/feed-31/tetrasensor-52.php#>
79. Okerman, L., Croubels, S., Cherlet, M., Wasch, K. de, Backer, P. de, van Hoof, J., *Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues*. Food Addit Contam. 2004. 21(2): p. 145–53
80. Bossuyt, R., van Renterghem, R., Waes, G., *Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography*. J. Chromatogr. 1976. 124(1): p. 37–42
81. Kowalski, P., *Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples*. J Pharm Biomed Anal. 2008. 47(3): p. 487–93
82. Miranda, J., Rodríguez, J., Galán-Vidal, C., *Simultaneous determination of tetracyclines in poultry muscle by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A. 2009. 1216(15): p. 3366–71
83. Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H., *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*. J Chromatogr A. 2000. 882(1-2): p. 109–33
84. Barker, S.A., Walker, C.C., *Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods*. J. Chromatogr. 1992. 624(1-2): p. 195–209
85. Posyniak, A., Mitrowska, K., Zmudzki, J., Niedzielska, J., *Analytical procedure for the determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys*. J Chromatogr A. 2005. 1088(1-2): p. 169–74
86. Pena, A., Pelantova, N., Lino, C.M., Silveira, M.I.N., Solich, P., *Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection*. J. Agric. Food Chem. 2005. 53(10): p. 3784–8
87. Bohm, D.A., Stachel, C.S., Gowik, P., *Validated determination of eight antibiotic substance groups in cattle and pig muscle by HPLC/MS/MS*. J AOAC Int. 2011. 94(2): p. 407–19
88. Anderson, C.R., Rupp, H.S., Wu, W.-H., *Complexities in tetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*. J Chromatogr A. 2005. 1075(1-2): p. 23–32
89. Oka, H., Ito, Y., Ikai, Y., Kagami, T., Harada, K., *Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods*. J Chromatogr A. 1998. 812(1-2): p. 309–19
90. Bogialli, S., Curini, R., Di Corcia, A., Laganà, A., Rizzuti, G., *A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 2006. 54(5): p. 1564–70

91. Sokol, J., Matisova, E., *Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction*. J Chromatogr A. 1994. 669(1-2): p. 75–80
92. Croubels, S., Vermeersch, H., Backer, P. de, Santos, M.D., Remon, J.P., van Peteghem, C., *Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys*. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1998. 708(1-2): p. 145–52
93. Cacciatore, G., Petz, M., *Optische Biosensoren, die neuen Augen der Rückstandsanalytiker*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 2005. 101(11): p. 501–8
94. Nakamura, H., Karube, I., *Current research activity in biosensors*. Anal Bioanal Chem. 2003. 377(3): p. 446–68
95. Baeumner, A.J., *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*. Anal Bioanal Chem. 2003. 377(3): p. 434–45
96. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Anal Bioanal Chem. 2003. 377(3): p. 528–39
97. Raether, H., *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*. 1988, Berlin, New York: Springer-Verlag
98. Homola, J. (ed.), *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*: Springer Berlin Heidelberg. 2006
99. Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G., *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B: Chemical. 1999. 54(1-2): p. 3–15
100. Fägerstam, L.G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B., Rönnerberg, I., *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis*. J. Chromatogr. 1992. 597(1-2): p. 397–410
101. Cooper, M.A., *Label-free screening of bio-molecular interactions*. Anal Bioanal Chem. 2003. 377(5): p. 834–42
102. Baird, C.L., Myszkowski, D.G., *Current and emerging commercial optical biosensors*. J. Mol. Recognit. 2001. 14(5): p. 261–8
103. Schasfoort, R.B.M., Tudos, A.J., *Handbook of surface plasmon resonance*. 2008, Cambridge: Royal Society of Chemistry
104. Nice, E.C., Catimel, B., *Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions*. Bioessays. 1999. 21(4): p. 339–52
105. Biacore AB, *Biacore Q - Instrument Handbook*. 2005
106. Biacore AB, *Technology Note 23: Label-free interaction analysis in real-time using surface plasmon resonance*. 2007.
http://www.biacore.com/lifesciences/technology/application_notes/index.html
107. Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L., Palleschi, G., *A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis*. Anal. Chim. Acta. 2007. 605(2): p. 111–29
108. Cooper, M.A., *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov. 2002. 1(7): p. 515–28
109. Mello, L.D., Kubota, L.T., *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. Food Chemistry. 2002. 77(2): p. 237–56
110. Haasnoot, W., Bienenmann-Ploum, M., Kohen, F., *Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum*. Analytica Chimica Acta. 2003. 483(1-2): p. 171–80
111. Cacciatore, G., Petz, M., Rachid, S., Hakenbeck, R., Bergwerff, A.A., *Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*. Analytica Chimica Acta. 2004. 520(1-2): p. 105–15

112. Sternesjö, A., Gustavsson, E., *Biosensor analysis of beta-lactams in milk using the carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein*. J AOAC Int. 2006. 89(3): p. 832–7
113. Caldow, M., Stead, S.L., Day, J., Sharman, M., Situ, C., Elliott, C., *Development and validation of an optical SPR biosensor assay for tylosin residues in honey*. J. Agric. Food Chem. 2005. 53(19): p. 7367–70
114. Haasnoot, W., Loomans, E.E.M.G., Cazemier, G., Dietrich, R., Verheijen, R., Bergwerff, A.A., Stephany, R.W., *Direct Versus Competitive Biosensor Immunoassays for the Detection of (Dihydro)Streptomycin Residues in Milk*. Food and Agricultural Immunology. 2002. 14(1): p. 15–27
115. Ferguson, J.P., Baxter, G.A., McEvoy, J.D.G., Stead, S., Rawlings, E., Sharman, M., *Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor*. Analyst. 2002. 127(7): p. 951–6
116. Huet, A.-C., Delahaut, P., Fodey, T., Haughey, S.A., Elliott, C., Weigel, S., *Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2010. 29(11): p. 1281–94
117. Petz, M., *Recent applications of surface plasmon resonance biosensors for analyzing residues and contaminants in food*. Monatsh Chem. 2009. 140(8): p. 953–64
118. McGrath, T.F., Elliott, C.T., Fodey, T.L., *Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food*. Anal Bioanal Chem. 2012. 403(1): p. 75–92
119. Korpela, M.T., Kurittu, J.S., Karvinen, J.T., Karp, M.T., *A recombinant Escherichia coli sensor strain for the detection of tetracyclines*. Anal. Chem. 1998. 70(21): p. 4457–62
120. Kurittu, J., Lönnberg, S., Virta, M., Karp, M., *A Group-Specific Microbiological Test for the Detection of Tetracycline Residues in Raw Milk*. J. Agric. Food Chem. 2000. 48(8): p. 3372–7
121. Pellinen, T., Bylund, G., Virta, M., Niemi, A., Karp, M., *Detection of traces of tetracyclines from fish with a bioluminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes*. J. Agric. Food Chem. 2002. 50(17): p. 4812–5
122. Virolainen, N.E., Pikkemaat, M.G., Elferink, J.W.A., Karp, M.T., *Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria*. J. Agric. Food Chem. 2008. 56(23): p. 11065–70
123. Pikkemaat, M., Rapallini, M., Karp, M., Elferink, J., *Application of a luminescent bacterial biosensor for the detection of tetracyclines in routine analysis of poultry muscle samples*. Food Additives & Contaminants: Part A. 2010. 27(8): p. 1112–7
124. Bahl, M.I., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., *Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene*. FEMS Microbiol. Lett. 2005. 253(2): p. 201–5
125. Pellinen, T., Huovinen, T., Karp, M., *A cell-free biosensor for the detection of transcriptional inducers using firefly luciferase as a reporter*. Analytical Biochemistry. 2004. 330(1): p. 52–7
126. Granier, B., Lepage, S., *Method of in vitro diagnostics based on mechanisms of gene regulation and diagnostic reagent therefore*. G01N33/543
127. Möller, N., Müller-Seitz, E., Scholz, O., Hillen, W., Bergwerff, A.A., Petz, M., *A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor*. Eur Food Res Technol. 2006. 224(3): p. 285–92

128. Andree, U., Müller-Seitz, E., Usai, I., Loeber, S., Gmeiner, P., Wimmer, C., Hillen, W., Petz, M., *Tetracycline sensing using novel doxycycline derivatives immobilized on different surface plasmon resonance biosensor surfaces*. *Bioanalysis*. 2010. 2(2): p. 217–27
129. Möller, N., *Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Elementen aus der Resistenzforschung zum Screening auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln*. Dissertation, Fachbereich C Lebensmittelchemie Bergische Universität Wuppertal. 2007
130. Andree, U., *Beitrag zur Biosensoranalytik von Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln mittels Oberflächenplasmonresonanz*. Dissertation, Fachbereich C Lebensmittelchemie Bergische Universität Wuppertal. 2009
131. Naidong, E., Roets, E., Busson, R., Hoogmartens, J., *Separation of keto-enol tautomers of chlortetracycline and 4-epichlortetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene)copolymer*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990. 8(8-12): p. 881-9
132. Kamionka, A., Bogdanska-Urbaniak, J., Scholz, O., Hillen, W., *Two mutations in the tetracycline repressor change the inducer anhydrotetracycline to a corepressor*. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32(2): p. 842–7

Internetadressen zuletzt geprüft am 28.07.2013