

Entwicklung, Optimierung und Validierung eines
rezeptorproteingestützten Mikrotiterplatten-Tests zur
Rückstandsanalytik von β -Lactam-Antibiotika

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

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegte Dissertation

von

Janine Lamar

Wuppertal

2007

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20070084

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20070084>]

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Betreuung von

Herrn Prof. Dr. M. Petz

an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich Mathematik und
Naturwissenschaften, Fachgebiet Lebensmittelchemie

in der Zeit von Januar 2004 bis November 2006

ABSTRACT

The recombinantly obtained *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein PBP 2x* has been utilised to develop a novel microtiter plate assay for the detection and determination of penicillins and cephalosporins in milk, honey, porcine, bovine, turkey and deer muscle tissue and egg. The major advantage in using PBP 2x* is that only intact beta-lactams are detected and both, penicillins and cephalosporins, can be screened within one assay.

In the assay, the receptor protein was immobilised to a microplate in the first step. To each sample a bifunctional reagent synthesised for this assay was added, with ampicillin and digoxigenin as functional groups (DIG-AMPI). The amount of bifunctional reagent, which was bound via its ampicillin part to the receptor protein, decreased with increasing beta-lactam concentration in the sample. The detection step used anti-digoxigenin F_{ab} fragments marked with horseradish peroxidase. The more bifunctional reagent was bound to the receptor protein, the more antibody fragments were bound via the digoxigenin part of the reagent. A maximum colour development with hydrogen peroxide as substrate for the peroxidase and tetramethylbenzidine as chromogen was achieved, when no beta-lactam residues were present. Consequently, the colour development was reversely related to the beta-lactam concentration in the sample.

The expression of PBP 2x* as recombinant protein in *Escherichia coli* and the following purification by affinity chromatography were optimised to achieve high protein amounts.

Chemometric experimental design was used to optimise the assay procedure. A fractional factorial design was created to detect effects and interactions of the assay parameters. For final optimisation of the significant parameters a Box-Behnken design was used. As a result of the optimisation, operation parameters could be selected, which allowed a low consumption of PBP 2x* as the most valuable reagent, while keeping sensitivity at the necessary high level.

The assay has been developed for various food matrices to screen for residues of beta-lactam antibiotics. Except cefalonium, all EU relevant beta-lactam antibiotics could be detected at concentrations around their respective MRL. Cefalonium had a too low binding affinity to PBP 2x*, so that the detection at its MRL was not possible. Matrix interferences could be eliminated by tenfold dilution of raw milk, porcine and turkey muscle meat, honey and egg. The matrix effect observed with raw milk could also be eliminated by a centrifugation step only. Matrix interferences caused by bovine muscle tissue and albumen could only be partially reduced by a tenfold dilution. For the analysis of deer muscle tissue a membrane filtration step was necessary prior to the dilution step. Samples of albumen, bovine and deer muscle tissue needed matrix blank samples using the same microplate for reliable beta-lactam identification.

A validation using the principles of EU decision 2002/657 was performed for benzylpenicillin, ampicillin, cefquinome and cefoperazone in milk. The developed microplate assay satisfied the criteria for specificity, reproducibility, precision and accuracy. CC α and CC β values were calculated. A set of 8 blind-fortified samples for each of the four beta-lactams was analysed. All blanks were correctly identified and a very high accuracy for quantitative results was observed.

At the Federal Research Centre for Nutrition and Food (Institute for Hygiene and Food Safety) at the location in Kiel the excretion of antibiotics (e.g. benzylpenicillin, ampicillin, cefquinome and cefoperazone) in milk was studied. There, the residues were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection and different screening methods. From these experiments 289 milk samples (with the four β -lactam antibiotics mentioned above) preserved by lyophilization were available. With these samples and by comparison of the microtiter plate assay results and the HPLC results obtained in Kiel the opportunity to use the microtiter plate assay as quantitative assay (when the identity of the residual beta-lactam is known), the quantitative accuracy and the validity of the developed microplate receptor assay were checked. No false positive reactions could be detected, giving a diagnostic specificity of 100 %. No false negative samples could be observed as well.

In conclusion the results indicate that the assay has the potential to emerge into a screening assay for routine use.

DANK

Herrn Prof. Dr. Michael Petz gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, seine Motivation während einiger Tiefphasen, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Freiheiten bei der Planung und Durchführung.

Herrn Prof. Dr. Helmut Guth danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck, Universität Kaiserslautern, bedanken, die den Stamm zur Expression von PBP 2x* bereitgestellt hat.

Bei Frau Dr. Gertraud Suhren, BfEL Kiel, möchte ich mich für die Bereitstellung lyophilisierter Milchproben aus Medikationsstudien sowie der Untersuchung dieser mittels HPLC und anderer Testsysteme bedanken.

Herrn Dr. Giuseppe Cacciatore danke ich für die vielen praktischen Tipps bei der Isolierung des PBP 2x* und der DIG-AMPI-Synthese.

Frau Ulrike Andree und Herrn Matthias Kotthoff möchte ich für die Dotierung der Proben zur Durchführung der verdeckten Kontrollanalysen sowie Herrn Kotthoff für die Arbeiten als 2. Anwender im Rahmen der Validierung danken.

Ein Dankeschön geht an meine Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das schöne Arbeitsklima, in dem diese Arbeit entstand.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Sachmittelförderung im Rahmen des Projektes PE 306/7-1.

Der größte Dank gilt allerdings meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht und mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt haben und außerdem mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin.

***Für meine geliebten Eltern
Werner und Elke Lamar***

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Penicilline und Cephalosporine | 3 |
| 2.1 Strukturen und Reaktivität der β -Lactam-Antibiotika | 3 |
| 2.1.1. Penicilline | 4 |
| 2.1.2. Cephalosporine | 6 |
| 2.1.3. Reaktivität der Penicilline und Cephalosporine | 9 |
| 2.2 Wirkungsmechanismus | 11 |
| 2.2.1. Aufbau der bakteriellen Zellwand | 11 |
| 2.2.2. Ablauf der Murein-Biosynthese | 14 |
| 2.2.3. D,D-Transpeptidasen | 16 |
| 2.3 Penicillin-bindende Proteine (PBP) | 18 |
| 2.3.1. Plasmid pGEX-tet-PBP 2x* | 20 |
| 2.4 Resistenzbildung | 22 |
| 2.4.1. Zugangsbehinderung | 23 |
| 2.4.2. Veränderung der Zielstruktur | 23 |
| 2.4.3. Inhibierung durch β -Lactamasen | 23 |
| 2.5 β -Lactam-Rückstände in Lebensmitteln | 24 |
| 2.5.1. Einsatz in der Veterinärmedizin | 24 |
| 2.5.2. Rückstandsbildung – Metabolisierung und Elimination | 25 |
| 2.5.3. Rückstandsbeurteilung – Toxizität und allergenes Potential | 26 |
| 2.6 Regelungen zur Rückstandsbeurteilungen | 27 |
| 2.7 Analytik von β -Lactam-Antibiotika | 29 |
| 2.7.1. Screening-Methoden | 29 |
| 2.7.1.1. Mikrobiologische Hemmstofftests | 29 |
| 2.7.1.2. Immunchemische Testsysteme | 30 |
| 2.7.1.3. Rezeptortests | 31 |
| 2.7.1.4. Zusammenfassung der Screening-Tests | 32 |
| 2.7.2. Chemisch-physikalische Methoden | 33 |
| 3. Grundlagen der chemometrischen Optimierung | 34 |
| 3.1 Schrittweise Optimierung | 34 |
| 3.2 Simultane Optimierung | 34 |
| 3.2.1. Screening-Designs | 34 |
| 3.2.1.1 Full Factorial Design | 35 |
| 3.2.1.2 Fractional Factorial Design | 35 |
| 3.2.1.3 Durchführung und Auswertung von Screening-Designs | 37 |
| 3.2.2. Optimierungs-Designs | 42 |
| 3.2.2.1 Full Factorial Designs | 42 |
| 3.2.2.2 Central Composite Designs | 43 |
| 3.2.2.3 Box-Behnken Designs | 43 |
| 3.2.2.4 Durchführung und Auswertung von Optimierungs-Designs | 43 |
| 4. Immunoassays (ELISA) | 46 |
| 5. Zielsetzung | 49 |
| 6. Ergebnisse und Diskussion | 51 |
| 6.1 Isolierung, Synthese und Charakterisierung der essentiellen Komponenten ... | 51 |
| 6.1.1. Bakterienanzucht / Erhöhung der Proteinausbeute | 51 |
| 6.1.2. Identifizierung des PBP 2x* | 54 |
| 6.1.2.1 Gelelektrophorese | 54 |
| 6.1.2.2 Gelfiltrationschromatographie | 55 |

| | |
|--|------------|
| 6.1.3. Lagerstabilität PBP 2x* | 56 |
| 6.1.4. Synthese des Digoxigenin-markierten Ampicillin | 58 |
| 6.2 Testentwicklung | 60 |
| 6.2.1 Mikrotiterplattenauswahl | 60 |
| 6.2.2 Auswahl der Blockpuffer | 62 |
| 6.2.3 Schachbretttitration | 64 |
| 6.2.4 Simultane und konsekutive Kompetitorzugabe | 64 |
| 6.2.5 Plattenlagerung | 65 |
| 6.2.6 Erarbeitetes Testprinzip | 67 |
| 6.3 Chemometrische Optimierung des entwickelten Mikrotiter-plattenassays mittels Experimental Design | 68 |
| 6.3.1 Screening Design | 68 |
| 6.3.1.1 Experimentelles | 68 |
| 6.3.1.2 Design-Planung | 70 |
| 6.3.1.3 Auswertung | 71 |
| 6.3.2 Optimierungs-Design | 77 |
| 6.3.2.1 Experimentelles | 77 |
| 6.3.2.2 Design-Planung | 77 |
| 6.3.2.3 Auswertung | 78 |
| 6.3.3 Ergebnisvergleich Schachbretttitration vs. Experimental Design | 82 |
| 6.4 Untersuchungen mit β -Lactam-Standardsubstanzen | 83 |
| 6.4.1 Penicilline | 83 |
| 6.4.2 Cephalosporine | 89 |
| 6.4.3 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität | 97 |
| 6.5 Matrixeinflüsse | 99 |
| 6.5.1 Milch | 99 |
| 6.5.1.1 Rohmilch | 99 |
| 6.5.1.2 Konsummilch | 101 |
| 6.5.1.3 Ziegenmilch | 102 |
| 6.5.1.4 Zusammenfassung der Milchuntersuchungen | 102 |
| 6.5.2 Muskelfleisch | 102 |
| 6.5.2.1 Schwein | 103 |
| 6.5.2.2 Rind | 104 |
| 6.5.2.3 Hirsch | 105 |
| 6.5.2.4 Pute | 108 |
| 6.5.2.5 Zusammenfassung der Untersuchungen des Muskelfleisches | 109 |
| 6.5.3 Honig | 110 |
| 6.5.4 Ei | 111 |
| 6.5.5 Zusammenfassung der Matrixuntersuchungen | 112 |
| 6.6 Validierung des Testsystems für Rohmilch | 113 |
| 6.6.1 Spezifität | 113 |
| 6.6.2 Richtigkeit / Wiederfindung | 114 |
| 6.6.3 Wiederholpräzision | 115 |
| 6.6.4 Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ und Nachweisvermögen $CC\beta$ | 117 |
| 6.6.5 Nachweisgrenze (LOD) | 118 |
| 6.6.6 Verdeckte Kontrollanalysen | 120 |
| 6.7 Analyse von gewachsenen Rückständen in lyophilisierten Rohmilchproben | 122 |
| 6.7.1 Qualitatives Screening | 123 |
| 6.7.2 Quantitative Bestimmung | 127 |
| 7. Schlussbetrachtung und Ausblick | 130 |
| 8. Zusammenfassung | 132 |

| | |
|---|------------|
| 9. Arbeitsvorschriften | 135 |
| 9.1 Expression und Aufreinigung des PBP 2x* | 135 |
| 9.2 Proteinbestimmung nach Bradford..... | 139 |
| 9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 140 |
| 9.3.1 Herstellung des Polyacrylamidgels (Minigel) | 142 |
| 9.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese | 143 |
| 9.3.3 Gelfärbung..... | 143 |
| 9.4 DIG-AMPI-Synthese..... | 144 |
| 9.5 Analysen mittels Mikrotiterplattentest..... | 147 |
| 9.5.1 Plattenbeschichtung | 151 |
| 9.5.2 Testablauf..... | 151 |
| 9.5.3 Schachbretttitration..... | 153 |
| 9.5.4 Dotierung der Lebensmittelproben | 154 |
| 9.5.5 Analyse von Milch..... | 155 |
| 9.5.6 Analyse von Muskelfleisch | 155 |
| 9.5.7 Analyse von Ei..... | 155 |
| 9.5.8 Analyse von Honig | 156 |
| 9.5.9 Aufarbeitung der lyophilisierten Rohmilchproben | 156 |
| 9.6 Analysen mit dem Charm II-Rezeptortestverfahren | 157 |
| 9.7 Analysen mittels Beta Star-Test..... | 159 |
| 9.8 Verwendete Software..... | 160 |
| 10. Literaturverzeichnis | 161 |
| Abkürzungsverzeichnis | 173 |
| Anhang | 174 |

1. Einleitung

In der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung dienen Antibiotika zur Prophylaxe, Metaphylaxe oder Therapie mikrobiell bedingter Erkrankungen und können parenteral, oral, lokal, intramammär, etc. verabreicht werden. Häufige Bestandsbehandlungen (Einsatz über Fütterungsarzneimittel), aber auch falsche Dosierung, falsche Verabreichung oder Nichtbeachtung von Wartezeiten können jedoch zu Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs führen und stellen ein beachtenswertes Problem dar. So können Antibiotika das Wachstum von Starterkulturen inhibieren, die menschliche Darmflora beeinflussen und bei penicillinsensiblen Menschen zu allergischen Reaktionen führen [1].

Für den freien Warenverkehr und zum Schutz der öffentlichen Gesundheit sind deshalb innerhalb der Europäischen Union (EU) alle Mitgliedsstaaten durch die Verordnung 2377/90/EWG verpflichtet, die Einhaltung von Rückstandshöchstmengen (MRL = engl. maximum residue limit) für alle auf dem Markt befindlichen wirksamen Bestandteilen von Tierarzneimitteln in essbaren Geweben und anderen Produkten tierischen Ursprungs zu gewährleisten [2]. Rückstände in tierischen Lebensmitteln, die unterhalb dieser MRL liegen, stellen keine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Um einen hohen Grad an Sicherheit sowohl für den Anwender von Tierarzneimitteln als auch für den Verbraucher zu garantieren, dass die MRL-Werte in Geweben und tierischen Produkten nicht überschritten werden, wurden so genannte Wartezeiten eingeführt. Die Wartezeit stellt den Zeitraum dar, der zwischen der letzten bestimmungsgemäßen Anwendung und dem Zeitpunkt der Lebensmittelgewinnung (z.B. Schlachtung) liegt [3]. Jedoch garantiert nur die Kontrolle der Einhaltung von Wartezeiten und der MRL einen verlässlichen Verbraucherschutz. Eine systematische Überwachung wird durch die Richtlinie 96/23/EG über die Untersuchung von Tieren und frischem Fleisch erreicht. Diese Richtlinie stellt die Grundlage des Nationalen Rückstandskontrollplanes dar. Dieser ist durch das Lebensmittelrecht, Fleischhygienerecht und Geflügelfleischhygienerecht im nationalen Recht verankert und wird im Rahmen der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung durchgeführt. Eigenkontrollen führt die Lebensmittelindustrie im Rahmen der Qualitätssicherung durch. So stellen Antibiotika

zum Beispiel in der Milchindustrie ein Problem dar, weil sie das Wachstum der Starterkulturen inhibieren.

So benötigen sowohl amtliche und kommerzielle Untersuchungseinrichtungen als auch die Lebensmittelindustrie schnelle, empfindliche und validierte Untersuchungsmethoden. Zum Screening auf Antibiotikarückstände werden dabei meistens mikrobiologische, immunchemische und biochemische Testsysteme verwendet, wobei zur Identifizierung und Quantifizierung chemisch-physikalische Methoden zum Einsatz kommen.

In dieser Dissertation lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung, Optimierung und Validierung eines rezeptorproteingestützten Mikrotiterplattentests zum Screening auf β -Lactam-Antibiotika in Milch und anderen Matrices. Weiterhin wurden die dafür benötigten biomolekularen Erkennungspartner isoliert und synthetisiert.

Für den Nachweis wurde das Penicillin-bindende Protein PBP 2x* verwendet, das schon bei der Entwicklung eines Biosensor-Assays auf Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz verwendet worden ist [4].

2. Penicilline und Cephalosporine

Der Begriff Penicillin wurde 1929 durch Alexander Fleming geprägt und steht für die antibakterielle Substanz, die von verschiedenen Schimmelpilzen, z. B. *Penicillium notatum*, gebildet wird und gegenüber *Staphylokokken* antimikrobielle Wirkung zeigte [5]. Die Gruppe um Chain und Florey begann 10 Jahre nach der Entdeckung Flemings mit der systematischen Erforschung und der Isolation von Benzylpenicillin (Penicillin G) [6]. Sehr schnell fand dann das Antibiotikum Einzug in die Human-, aber auch Veterinärmedizin. So fand 1946 die Markteinführung des Penicillinwundpuders statt.

Vergleichbar mit der Entdeckung des Penicillins war die Entdeckung des Cephalosporins. Die Cephalosporine N, G und C wurden 1945 von Giuseppe Brotzu entdeckt. Dieser entdeckte, dass durch den von ihm isolierten Pilz aus einer Seewasserprobe ebenfalls Extrakte gewonnen werden konnten, die antimikrobielle Wirkung zeigten. Da diese nun entgegen dem Penicillin ein erweitertes Wirkungsspektrum aufwiesen und auch gegen gram-negative Keime wirksam waren, wurde die Antibiotikaklasse der Cephalosporine entwickelt [7].

Bei der Behandlung von Nutztieren in der Landwirtschaft sind die β -Lactame neben den Tetracyclinen und Makroliden die bedeutendste Gruppe, wobei bei den β -Lactamen heutzutage die Penicilline eine weitaus größere Rolle spielen als die Cephalosporine [8].

2.1 Strukturen und Reaktivität der β -Lactam-Antibiotika

Die β -Lactam-Antibiotika lassen sich in unterschiedliche Klassen, wie zum Beispiel in Penicilline und Cephalosporine, unterteilen. Allen Klassen ist ein Strukturmerkmal gemeinsam – der β -Lactam-Ring. Dieser wurde 1945 zum ersten Mal als Bestandteil von Benzylpenicillin röntgenspektroskopisch nachgewiesen [9]. Im Allgemeinen ist über das Stickstoffatom und das angrenzende C-Atom am β -Lactam-Ring ein Ringsystem (fünf- oder sechsgliedrig) ankondensiert. Eine Ausnahme bilden hierbei nur die monocyclischen β -Lactame, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Die Aktivität und das antibakterielle Spektrum der β -Lactame werden dabei durch die physikochemischen Eigenschaften bestimmt. Die Wirksamkeit gegenüber

gram-positiven Bakterien wird durch eine erhöhte Lipophilie, gegen gram-negative Bakterien durch Erhöhung der Hydrophilie (Penetration durch die wassergefüllten Porine) erreicht. Eine Erhöhung der Säurestabilität kann durch elektronenziehende Substituenten erzielt werden (Phenoxypenicillin), eine erhöhte β -Lactamase-Stabilität durch Einführung eines phenylsubstituierten Isoxazolringes und eines Methoxysubstituenten am β -Lactamring, woraus eine sterische Hinderung resultiert und es damit zu einer Blockierung des Angriffs der β -Lactamasen kommt [10].

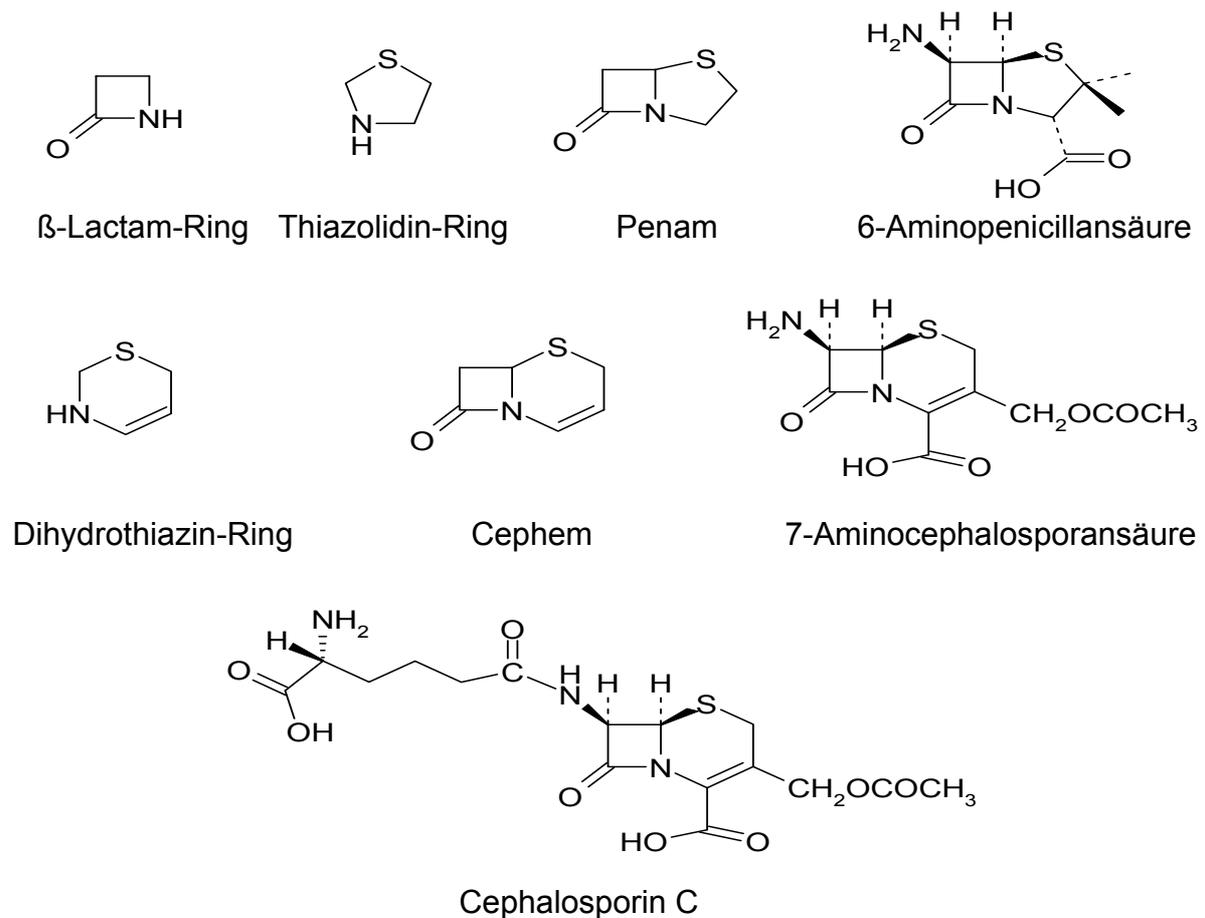


Abbildung 1: Grundstrukturen der Penicilline und Cephalosporine

2.1.1. Penicilline

In der EU sind zurzeit 9 verschiedene Penicilline zur Behandlung von lebensmittel-liefernden Tieren zugelassen. In Tabelle 1 sind die Penicilline, ihre Klassifizierung und Anwendungsgebiete sowie die letzte Änderungsverordnung zur MRL-Festlegung des jeweiligen Penicillins dargestellt.

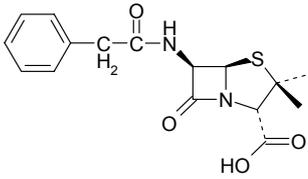
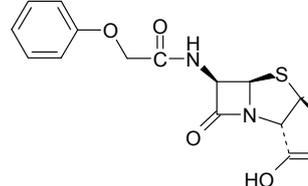
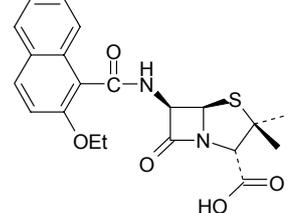
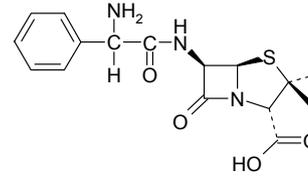
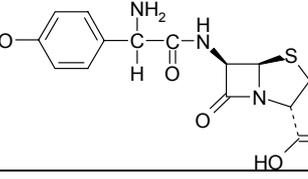
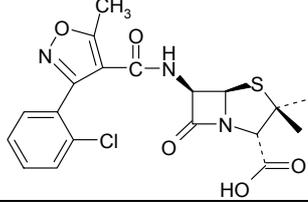
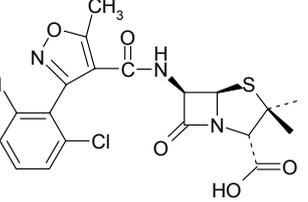
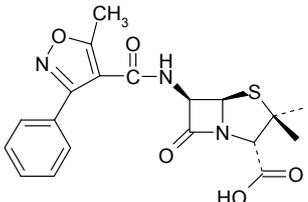
| | Struktur | Klassifizierung | Anwendung | MRL- VO* |
|--|---|---|---|-----------------|
| Benzylpenicillin (Penicillin G) |  | Monobasisches Penicillin; natürliches Penicillin | Mastitis, akute Infektionen | [11] |
| Phenoxymethyl- penicillin (Penicillin V) |  | Monobasisches Penicillin; natürliches Penicillin | akute Infektionen; nicht für Rinder zugelassen | [12] |
| Nafcillin |  | Monobasisches Penicillin; penicillinasefestes Penicillin | Mastitis | [13] |
| Ampicillin |  | Amphoterer Penicillin; Aminopenicillin | Mastitis, akute Infektionen | [11] |
| Amoxicillin |  | Amphoterer Penicillin; Aminopenicillin | Mastitis, akute Infektionen | [11] |
| Cloxacillin |  | Isoxazolympenicillin; penicillinasefestes Penicillin | Mastitis | [11] |
| Dicloxacillin |  | Isoxazolympenicillin; penicillinasefestes Penicillin | Mastitis | [11] |
| Oxacillin |  | Isoxazolympenicillin; penicillinasefestes Penicillin | Mastitis | [11] |

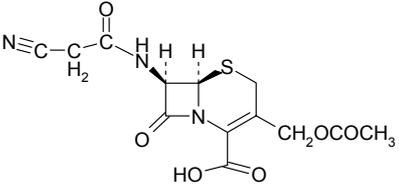
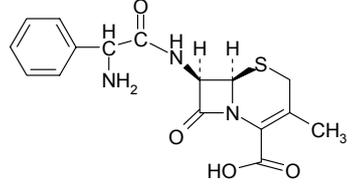
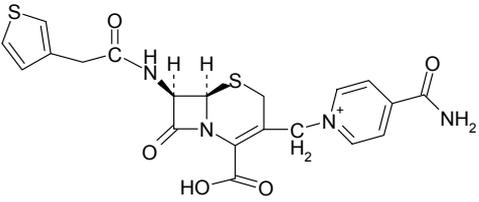
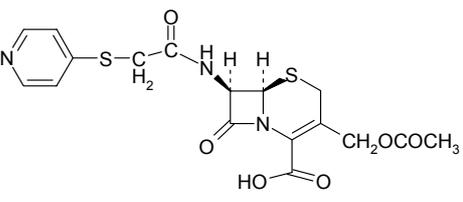
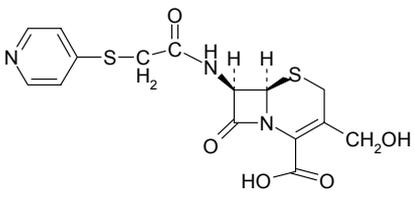
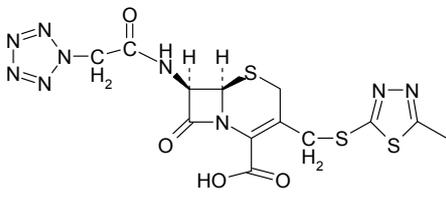
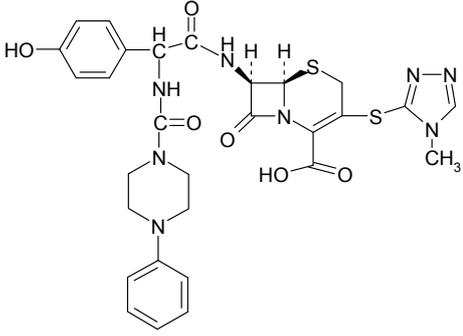
Tabelle 1: In der EU für lebensmittelliefernde Tiere zugelassene Penicilline sowie ihre Klassifizierung und Anwendungsgebiete; *letzte Änderungsverordnung zur MRL-Festlegung

Wie die Strukturen der Penicilline erkennen lassen, gehören die Penicilline zu den Carbonsäuren. Ihr Grundkörper (Abbildung 1) besteht aus einem Kondensationsprodukt aus β -Lactam- und Thiazolidin-Ring, dem Penam [14]. Außer zwei Penicillinen (Benzylpenicillin und Phenoxymethylpenicillin) werden alle anderen Penicilline semisynthetisch hergestellt. Die Synthese erfolgt ausgehend von der 6-Aminopenicillansäure (6-APA), die wiederum enzymatisch aus Benzylpenicillin oder Phenoxymethylpenicillin gewonnen wird [15], durch Anknüpfung der entsprechenden Seitenketten an deren Aminogruppe [16,17]. Wichtig ist dabei, dass von den acht möglichen stereoisomeren Formen nur die 3S,5R,6R-Konfiguration gebildet wird, da nur diese antibakteriell wirksam ist [14].

2.1.2. Cephalosporine

Im Gegensatz zu den Penicillinen enthalten die Cephalosporine statt des Thiazolidin-Ringes einen Dihydrothiazin-Ring. Der daraus resultierende Grundkörper ist das Cephem. Außerdem werden alle Cephalosporine ausgehend von Benzylpenicillin oder Phenoxymethylpenicillin durch Ringerweiterung bzw. durch Modifikation der 7-Aminocephalosporansäure semisynthetisch hergestellt [16,18]. Die 7-Aminocephalosporansäure wird wiederum enzymatisch aus Cephalosporin C synthetisiert [19]. Die Grundstrukturen der Cephalosporine sowie das Cephalosporin C sind in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 2 zeigt die in der EU zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Cephalosporine, sowie ihrer Einteilung in vier verschiedene Klassen, ihre Anwendungsgebiete und die letzte Änderungsverordnung zur MRL-Festlegung des jeweiligen Cephalosporins.

| | Struktur | Klassifizierung | Anwendung | MRL- VO* |
|-------------------------|---|------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Cefacetril |  | Generation 1 | Mastitis | [20] |
| Cefalexin |  | Generation 1 | Mastitis, akute Infektionen | [21] |
| Cefalonium |  | Generation 1 | Mastitis, Conjunctivitis | [22] |
| Cefapirin |  | Generation 1 | Mastitis, Endometritis | [23] |
| Desacetyl- cefapirin |  | Generation 1 | Metabolit des Cefapirins | [23] |
| Cefazolin |  | Generation 1 | Mastitis | [24] |
| Cefoperazon |  | Generation 3 | Mastitis | [25] |

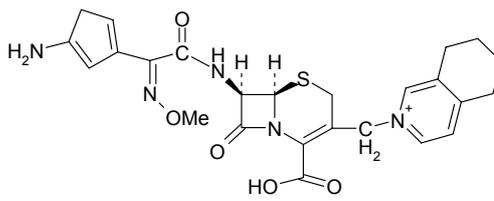
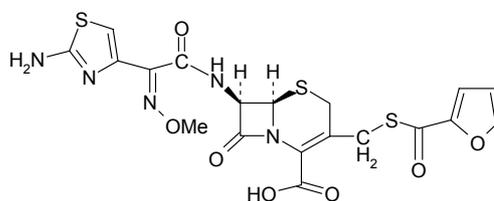
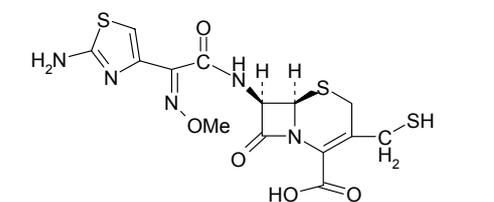
| | | | | |
|---|---|---------------------|--|-------------|
| <p>Cefquinom (Gegenion: Sulfat)</p> |  | <p>Generation 4</p> | <p>Mastitis, akute Infektionen</p> | <p>[26]</p> |
| <p>Ceftiofur</p> |  | <p>Generation 3</p> | <p>akute Infektionen</p> | <p>[27]</p> |
| <p>Desfuroyl- ceftiofur</p> |  | <p>Generation 3</p> | <p>Metabolit des Ceftiofurs</p> | <p>[27]</p> |

Tabelle 2: In der EU für lebensmittelliefernde Tiere zugelassene Cephalosporine (alphabetisch geordnet) sowie ihre Klassifizierung und Anwendungsgebiete; * letzte Änderungsverordnung zur MRL-Festlegung

Die Generation 1 (Narrow-Spectrum) stellt dabei die Klasse der Cephalosporine dar, die hauptsächlich gegen gram-positive Bakterien wirksam sind und in den 60er und 70er Jahren eingeführt wurden. Die zweite Generation (Expanded-Spectrum) wurde dann Ende der 70er Jahre eingeführt und zeigt eine erhöhte β -Lactamaseresistenz sowie ein breiteres Wirkungsspektrum. Für die Veterinärmedizin ist jedoch zurzeit kein Cephalosporin der zweiten Generation zugelassen. Anfang der 80er Jahre folgten dann die Cephalosporine der 3. Generation (Broad-Spectrum), die sich durch eine erhöhte Wirksamkeit gegen gram-negative Bakterien auszeichneten. Die verbesserte Wirksamkeit gegen gram-negative Bakterien ging jedoch zu Lasten der Wirksamkeit gegen gram-positive Bakterien. Die neuesten Vertreter sind die Cephalosporine der 4. Generation (Extended-Spectrum), deren β -Lactamase-Resistenz und Wirksamkeit gegenüber gram-negativen Bakterien im Gegensatz zu den Cephalosporinen der 3. Generation noch erhöht ist [28].

2.1.3. Reaktivität der Penicilline und Cephalosporine

Bei allen β -Lactam-Antibiotika erfolgt bei chemischen und biochemischen Vorgängen die Öffnung des β -Lactam-Ringes (Abbildung 2 a, b). Der geöffnete β -Lactam-Ring führt jedoch zu einer biologischen Inaktivierung der β -Lactame, da die Acylierung der Enzyme, die die bakterielle Zellwandsynthese katalysieren, einen intakten β -Lactam-Ring erfordert. Auch eine Bindung der β -Lactame an Proteine (Abbildung 2 c, d) kann erfolgen. Das resultierende Protein-Konjugat kann als Immunogen wirken und bei sensibilisierten Personen eine Allergie auslösen. Abbildung 2 zeigt die oben beschriebenen unterschiedlichen Ringöffnungsreaktionen.

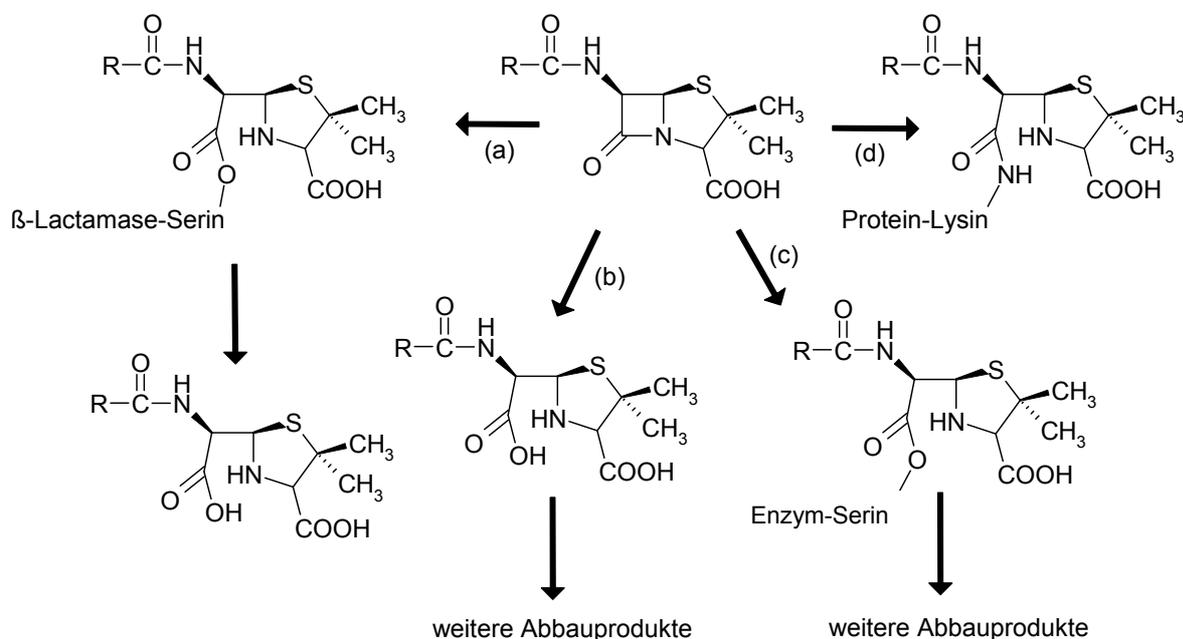


Abbildung 2: Ringöffnungsreaktionen am Beispiel der Penicilline (modifiziert nach [29]). (a): Enzymatische Hydrolyse, z. B. durch β -Lactamasen führt zur Bildung von Penicilloinsäuren; (b): Chemische Hydrolyse führt ebenfalls zur Bildung von Penicilloinsäuren; (c): Acylierung bakterieller Enzyme, auf der die antibakterielle Wirkung der β -Lactame beruht; (d): Bindung an Proteine, die im menschlichen Organismus zu einer allergischen Reaktion führen kann

Die Ringöffnung erfolgt unter basischen, neutralen sowie sauren Bedingungen [29,30]. Zudem zeigen die β -Lactam-Antibiotika eine erhöhte Reaktivität gegenüber Nucleophilen wie Zuckern, primären und sekundären Aminen, Thiolen und Zuckeralkoholen [31,32]. Auch kann ein verstärkter Abbau bei der Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Lebensmitteln stattfinden. Deshalb ist insbesondere bei der Probenaufarbeitung und der Durchführung von Analysen vorsichtig vorzugehen, damit keine Abbaureaktionen vor und während der Analyse ablaufen

[33,34]. Dabei verhalten sich Penicilline und Cephalosporine im basischen sowie im sauren Milieu sehr ähnlich [35]. Die Reaktion von Penicillinen und Cephalosporinen mit Nucleophilen stellt auch die Grundlage für die antibakterielle Wirkung der β -Lactame, die unter 2.2 beschrieben wird, dar. Statt der Hydroxid-Ionen bei chemischen Abbaureaktionen greift die OH-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum der betreffenden bakteriellen Enzyme als Nucleophil an und führt zu der β -Lactam-Ringöffnung. Die Reaktion von Penicillinen und Cephalosporinen mit Nucleophilen ist in Abbildung 3 dargestellt [29,31,36].

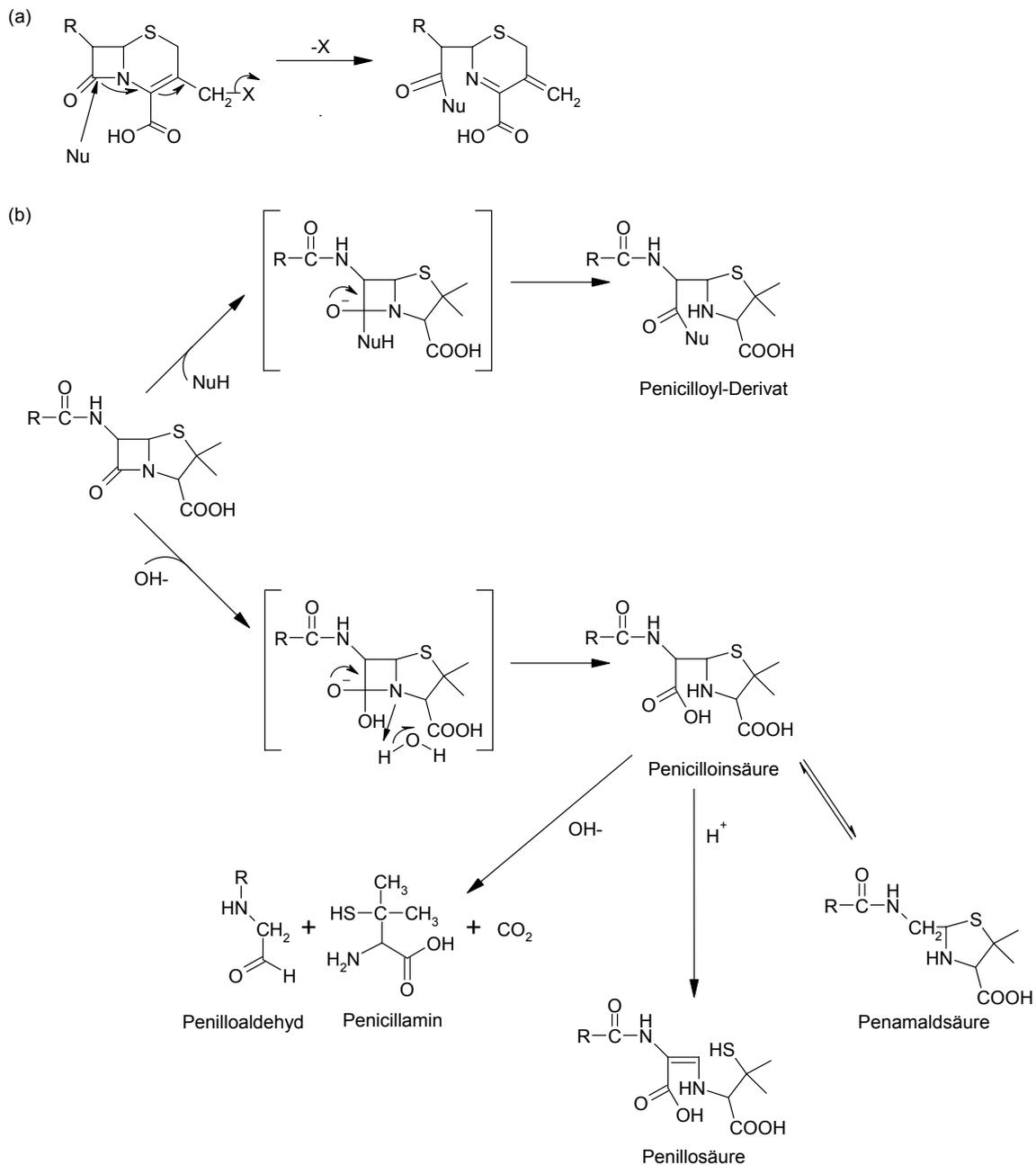


Abbildung 3: Reaktion der Penicilline und Cephalosporine mit Nucleophilen (modifiziert nach [31]). a: Abbau der Cephalosporine durch nucleophilen Angriff; b: Abbaureaktionen der Penicilline durch nucleophilen Angriff.

Auf die weiteren Reaktionsmöglichkeiten der β -Lactame im sauren Milieu soll hier nicht näher eingegangen werden, sondern es sei auf die entsprechende Literatur [35,37-40] verwiesen.

2.2 Wirkungsmechanismus

Die β -Lactam-Antibiotika hemmen die Zellwandsynthese, indem sie die Transpeptidierungsreaktion, die zu der Quervernetzung zweier glycanverbundener Peptidketten führt, hemmt. Das Enzym Transpeptidase, das diesen Schritt katalysiert, wird aufgrund der Eigenschaft, dass es ebenfalls als Angriffsort der Penicilline dient, auch als penicillinbindendes Protein (PBP) bezeichnet. Binden die PBP Penicilline, so findet die Transpeptidierung nicht statt, die Zellwandsynthese läuft aber ungeachtet dessen weiter ab. Die entstandene neue Zellwand weist nun keine Quervernetzung mehr auf und ist strukturell instabil, so dass es zur Ruptur und Lyse der Zelle kommt. Das Verständnis des molekularen Wirkungsmechanismus der β -Lactame setzt jedoch ein detailliertes Verständnis des Zellwandaufbaus und der Mureinbiosynthese voraus.

2.2.1. Aufbau der bakteriellen Zellwand

Das natürliche Penicillin G zeigt in erster Linie Wirkung gegen grampositive Erreger, da gramnegative Erreger undurchlässig für den Wirkstoff sind. Einige der später entwickelten halbsynthetischen Penicilline sind jedoch auch gegen gramnegative Bakterien wirksam, da die strukturellen Unterschiede in den N-Acylgruppen es ihnen erlauben, die äußere Membran der gramnegativen Bakterien zu überwinden [14,41]. Die strukturellen Unterschiede der Zellwände grampositiver und gramnegativer Bakterien werden im Folgenden weiter beschrieben.

Die Zellwand grampositiver Bakterien besteht aus mehreren Schichten Peptidoglykan (Murein), die der Cytoplasmamembran aufgelagert sind. Das Murein macht den Hauptbestandteil (90 %) der Zellwand aus und ist für Stoffe mit einem Molekulargewicht kleiner 55.000 Da durchlässig. Die Peptidoglykanschicht ist außerdem von Teichonsäuren, Proteinen und geringen Mengen Lipiden durchzogen [42,43]. Bei den gramnegativen Bakterien ist diese Peptidoglykanschicht dünner und macht nur 5 – 15 % der Zellwand aus. Ihr ist eine weitere zweischichtige Membran aufgelagert. Diese besteht aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden [41]. Außerdem ist diese mit Porinen durchsetzt, die eine Diffusion oder einen aktiven Transport von niedermolekularen Stoffen mit einem Molekulargewicht kleiner 600 Da in den periplasmatischen Raum zwischen äußerer und innerer Membran ermöglichen [44]. Ein weiterer Unterschied zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien besteht zudem im unterschiedlichen Aufbau des Peptidoglykans. So entsteht bei grampositiven Bakterien die Quervernetzung durch eine Interpeptidbrücke. Die Arten und Anzahl der Aminosäuren unterscheiden sich dabei von Organismus zu Organismus (Pentaglycin-Einheit bei *Staphylococcus aureus*). Bei gramnegativen Bakterien entsteht dagegen eine direkte Quervernetzung durch das Anknüpfen des Peptids der Aminogruppe der Diaminopimelinsäure an die Carboxylgruppe des terminalen D-Alanins (Abbildung 4). Beiden gemeinsam ist die Grundstruktur der einzelnen nebeneinander liegenden Peptidoglykanstränge, die durch die Zuckerderivate N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure gebildet werden. Diese sind durch Tetrapeptidquervernetzungen verknüpft. Die eigentliche Festigkeit kommt jedoch erst durch die oben beschriebenen zusätzlichen Quervernetzungen zustande.

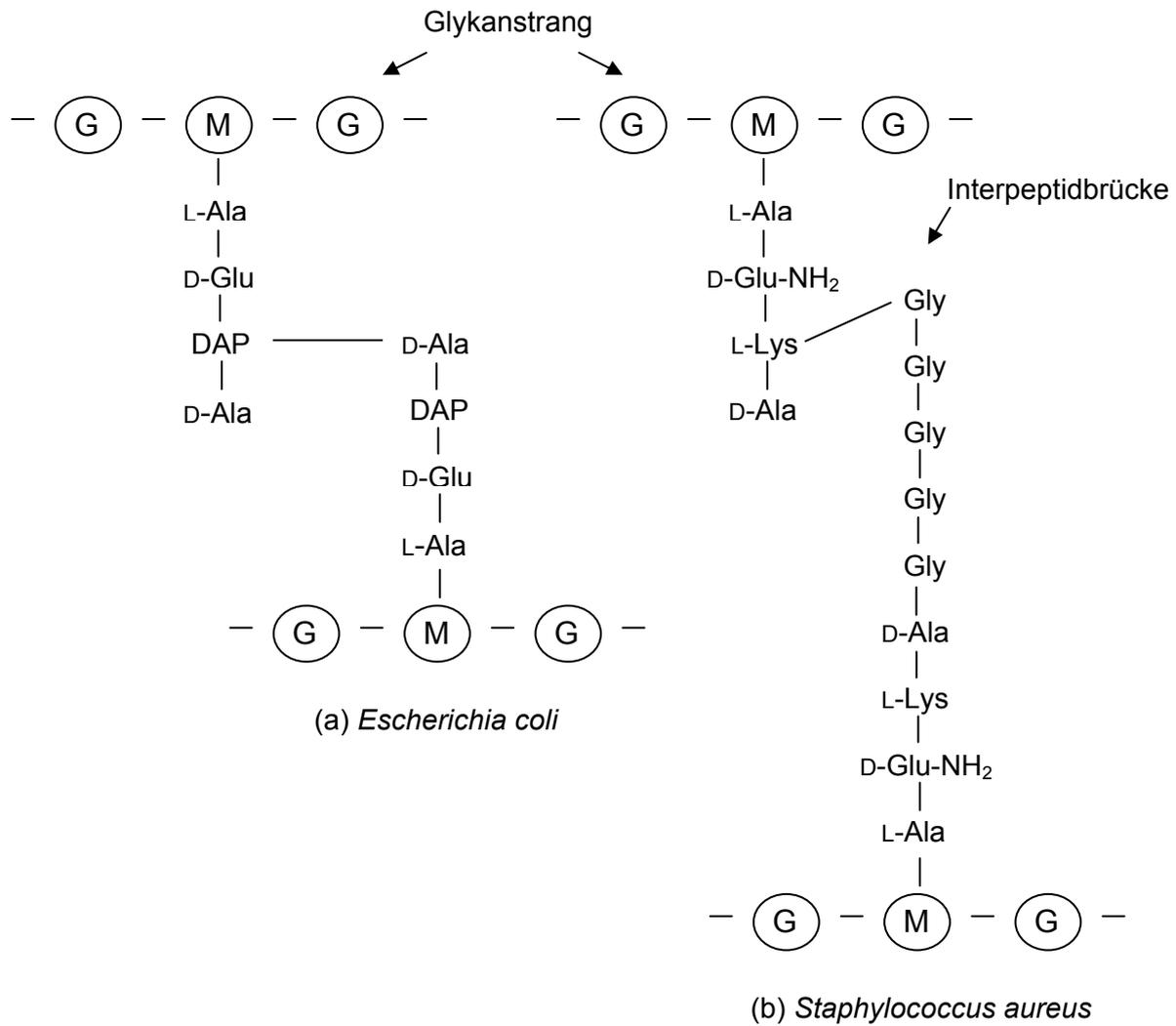


Abbildung 4: Aufbau des Peptidoglykans [modifiziert nach 41]. G: N-Acetylglucosamin; M: N-Acetylmuraminsäure; Ala: Alanin; Glu: Glutaminsäure; DAP: Diaminopimelinsäure; Glu-NH₂: Glutamin; Lys: Lysin; Gly: Glycin; (a) Bei gramnegativen Bakterien fehlt die Interpeptidbrücke (b) Pentaglycinbrücke bei dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus*.

Bei der Bildung der Quervernetzung greifen nun die β -Lactame ein, da sie die Murein-Biosynthese stören.

2.2.2. Ablauf der Murein-Biosynthese

Die Vergrößerung einer in sich geschlossenen Struktur erfordert nicht nur die Knüpfung von Bindungen, sondern auch die Öffnung bestehender Bindungen, damit neues Material in das bestehende Mureinnetz inseriert werden kann. Deshalb sind an der Biosynthese des Mureins nicht nur Mureinsynthasen wie Transpeptidasen und Transglycosidasen beteiligt, die die neue Mureinvernetzung bilden, sondern auch Mureinhydrolasen wie lytische Transglycosylasen, Endopeptidasen und Amidasen, die die kovalenten Bindungen im Murein aufschneiden (Abbildung 5).

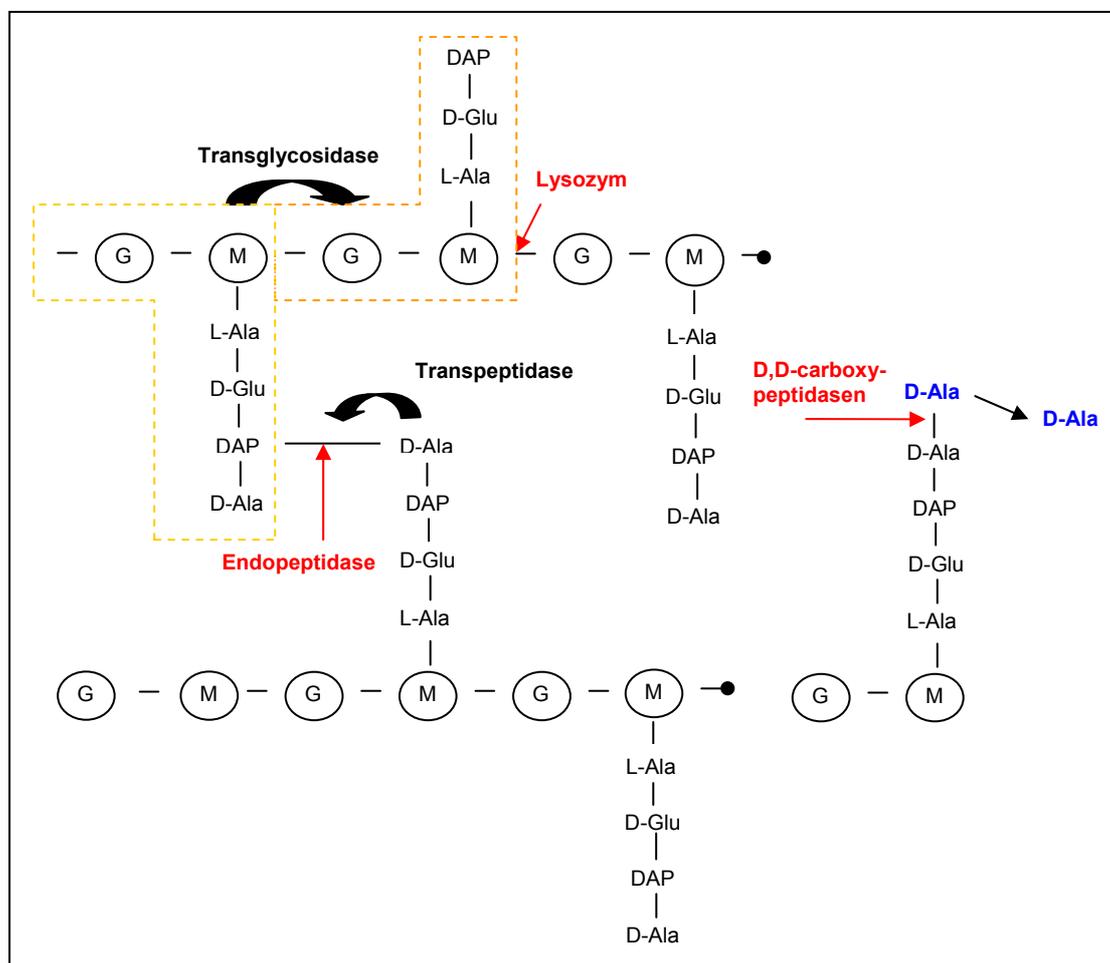


Abbildung 5: Angriffsorte, der an der Murein-Biosynthese beteiligten Enzyme (modifiziert nach [45]) G: N-Acetylglucosamin; M: N-Acetylmuraminsäure; Ala: Alanin; Glu: Glutaminsäure; DAP: Diaminopimelinsäure

Die Bindungsöffnung und die Insertion neuen Materials müssen sehr gut koordiniert sein, da die Stabilität des Mureinsacculus aufrechterhalten werden muss, um dem osmotischen Druck standzuhalten.

Die Mureinbiosynthese läuft dabei in zwei Schritten ab, wobei die terminalen Reaktionen, wie die Polymerisation zu Polysaccharidsträngen und der Einbau in die Zellwand an der Außenseite der Cytoplasmamembran stattfinden.

Ein im Cytoplasma gebildetes UDP-gebundenes N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid wird auf das lipophile Trägermolekül Undecaprenoylphosphat (Bactoprenol) übertragen und dabei das Lipid I gebildet. Nach Bindung an die Zellmembran unter Bildung von Lipid II und Verknüpfung mit N-Acetylglucosamid wird dann das Trägermolekül abgespalten [46-49]. An der Membranaußenseite katalysieren die Glykosyltransferasen die Synthese des Glykanstranges aus den Lipid-II-Molekülen. Die Quervernetzung erfolgt durch Transpeptidasen.

Nach dem „3-für-1“-Modell von Höltje werden drei neue quervernetzte Glykanstränge unter die bereits existierende Mureinschicht gehängt und anschließend in die bestehende Schicht eingezogen. Die Anheftung erfolgt über eine Transpeptidierung an bestehende dimere Quervernetzung einer Zuckerkette, dem Andockstrang. Das von Höltje postulierte Modell des Holoenzym erklärt dabei sehr gut die Koordination der synthetischen und hydrolytischen Aktivitäten. So gleitet das postulierte Holoenzym am Andockstrang entlang, wobei durch die am Kopf befindlichen synthetisierenden Enzyme das Murein-Triplett eingebaut und direkt im Anschluss der Andockstrang abgebaut wird [50].

Mit diesem Modell lässt sich auch die Lyse von Zellen in Gegenwart von β -Lactam-Antibiotika erklären. Die β -Lactame hemmen die Transpeptidierungsreaktion. Dies führt dazu, dass das Holoenzym am Andockstrang entlang gleitet, ohne neues Material zu inserieren. Die Mureinhydrolasen sind jedoch weiterhin aktiv und bauen den Andockstrang weiter ab, so dass die Struktur des Mureins destabilisiert wird und es zur Lyse der Zelle kommt. Für eine detailliertere Darstellung der Mureinbiosynthese sei auf die weiterführende Literatur [42,46,51-53] verwiesen.

2.2.3. D,D-Transpeptidasen

Wie bereits in 2.2.2 erwähnt, werden Transpeptidasen benötigt, um die Quervernetzung des Mureins zu bewerkstelligen. Bis 1965 war jedoch nicht klar, wie die antibakterielle Wirkung der β -Lactame und ihr Einfluss auf die D,D-Transpeptidasen erklärt werden könnte. Dass β -Lactame das natürliche Substrat der D,D-Transpeptidasen und D,D-Carboxypeptidasen imitieren, postulierten als erste Tipper und Strominger [53]. Das natürliche Substrat der D,D-Peptidasen ist das D-Alanyl-D-Alanin. Werden die Strukturen miteinander verglichen (Abbildung 6), so zeigt sich die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden Verbindungen.

Zusätzlich zu der strukturellen Ähnlichkeit kommt bei Benzylpenicillin noch eine vergleichbare elektrostatische Oberfläche hinzu [54,55].

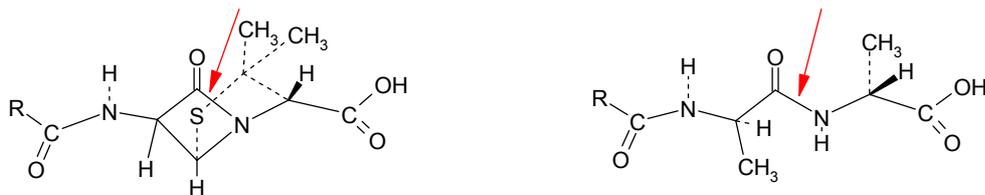


Abbildung 6: Strukturvergleich der D-Alanyl-D-Alanin-Sequenz (rechts) mit Penicillin (links).

Die roten Pfeile markieren die Bindungen, die durch die PBP gespalten werden (modifiziert nach [14])

Bei Abwesenheit von β -Lactam-Antibiotika wird bei der Quervernetzung des Mureins der terminale D-Alanin-Rest der Pentapeptidkette abgespalten, wobei es zu einer Esterbindung mit der OH-Gruppe eines Serin-Restes im aktiven Zentrum der D,D-Transpeptidase kommt. Ein nucleophiler Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Serinesters durch eine freie Aminogruppe, stammend aus einer benachbarten Peptidkette, eines L-Lysin-Rest oder meso-Diaminopimelinsäure-Rest, folgt in einem zweiten Schritt. Nach der Amidbildung wird das Enzym wieder freigesetzt [56-58]. Der Grad der Quervernetzung des Mureins kann zudem durch Carboxypeptidasen reguliert werden, indem von einigen Peptidketten nur der terminale D-Alanin-Rest abgetrennt wird [36].

Bei Anwesenheit von β -Lactam-Antibiotika greifen diese nun in die Quervernetzungsreaktion ein. Analog zum natürlichen Substrat greift die OH-Gruppe

des Serin-Restes der D,D-Transpeptidase den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidbindung des β -Lactam-Ringes an. Das daraus resultierende Penicilloyl- oder Cephalosporyl-Enzym-Konjugat ist jedoch sehr stabil, da das gebundene β -Lactam den Zugang von Akzeptor-Molekülen sterisch verhindert, so dass eine Übertragung der gebundenen β -Lactame auf eine Aminogruppe eines Akzeptor-Peptids nicht stattfinden kann. Gebundene β -Lactame können lediglich durch Wassermoleküle abgebaut werden, da diese Zugang zum aktiven Zentrum haben und als Nucleophil mit dem Carbonylkohlenstoff des Serinester reagieren können (siehe Abbildung 7), so dass es zu einer Hydrolyse der Serinesterbindung kommt.

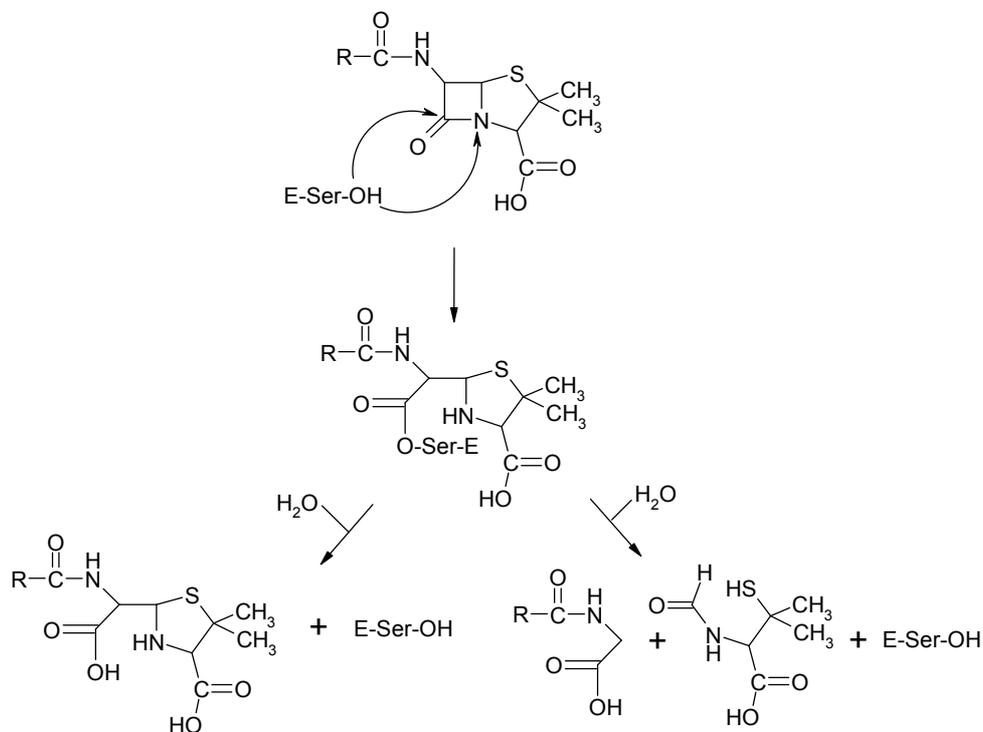


Abbildung 7: Inhibition der DD-Transpeptidasen durch β -Lactame. Bei der Acylierung der PBP durch Penicillin bilden sich Penicilloyl-Enzym-Konjugate. Je nach Enzym entstehen Penicilloinsäuren (linker Reaktionsweg) oder die Penicillinspaltprodukte N-Acyl-Glycin-Derivate und N-Formyl-D-Penicillamin [58,59]

Die Halbwertszeiten für ein Penicilloyl- oder Cephalosporyl-Enzym-Konjugat betragen je nach Enzym oder β -Lactam wenige Minuten bis zu mehreren Tagen. Letztendlich führt die Inhibition der D,D-Transpeptidasen zur Lyse der Zelle. Die β -Lactame hemmen ebenfalls die D,D-Carboxypeptidasen auf die beschriebene Weise. Für die antibakterielle Wirkung ist diese Reaktion jedoch von untergeordneter Bedeutung [60-62].

2.3 Penicillin-bindende Proteine (PBP)

Alle Peptidasen der Mureinbiosynthese, die in der Lage sind Penicilline und andere β -Lactam-Antibiotika kovalent zu binden werden aufgrund dieser Eigenschaft als Penicillin-bindende Proteine (PBP) bezeichnet. Grundsätzlich werden hochmolekulare und niedermolekulare PBP unterschieden. Zu den hochmolekularen PBP (HMW PBP) gehören das PBP 1, PBP 2 und PBP 3, die auch bei der Mureinbiosynthese von zentraler Bedeutung sind. PBP 2 ist dabei für das Längenwachstum essentiell, PBP 3 bei der Zellteilung [50,63]. Die Nummerierung erfolgt dabei nach absteigendem Molekulargewicht (PBP 1 100 kDa, PBP 2 80 kDa, etc.) [58]. Sind mehrere PBP mit einem vergleichbaren Molekulargewicht in einem Bakterium vorhanden, so werden die PBP zusätzlich mit einem Buchstaben versehen (z.B. PBP 2a oder PBP 2x). Eine weitere Unterteilung der PBP erfolgt in die Gruppe der PBP mit D,D-Carboxypeptidase-Aktivität und gelegentlicher D,D-Endopeptidase-Aktivität. Zu dieser Gruppe gehören vor allem PBP mit einem niedrigen Molekulargewicht. Die andere Gruppe ist die Gruppe der PBP mit D,D-Transpeptidase-Aktivität. Hierzu gehören die HMW PBP. Diese Gruppe wird dann noch in die Untergruppen HMW PBP der Klasse A und B eingeteilt. Die Klasse A HMW PBP besitzen neben der D,D-Transpeptidase-Aktivität auch Glykosyltransferase-Aktivität und agieren als Mureinpolymerasen. Die Klasse B HMW PBP besitzen ausschließlich eine D,D-Transpeptidase-Aktivität [47,56,64].

PBP gehören nach Goffin und Ghuysen [36] zur Gruppe der Serin-x-x-Lysin-Acyltransferasen, wobei x jeweils für eine variable Aminosäure steht. Die drei konservierten Aminosäuresequenzen (werden als Motive bezeichnet) sind in den meisten PBP vorhanden. Die drei Motive sind das Serin-x-x-Lysin (SxxK, Motiv 1), das Serin-x-Asparagin (SxN, Motiv 2) und Lysin-Threonin-Glycin (KTG, Motiv 3). In der Primärstruktur liegen diese in der aufgeführten Reihenfolge vor und bilden bei der Proteinfaltung die katalytisch aktive Kavität, die in Abbildung 8 für das in dieser Arbeit verwendete PBP 2x* dargestellt ist.

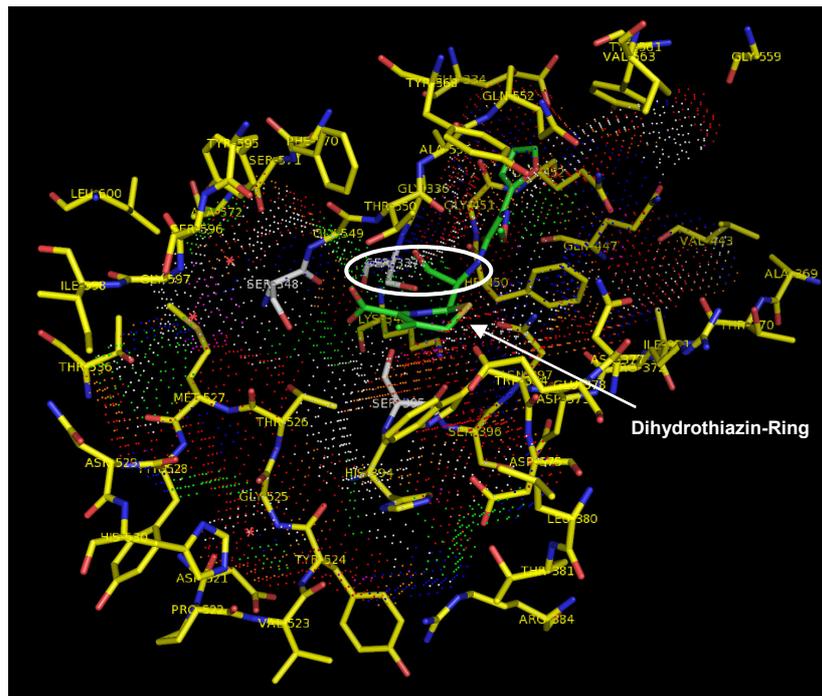
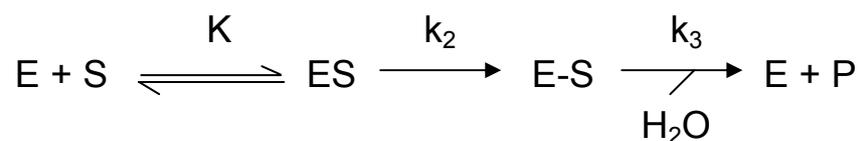


Abbildung 8: Darstellung der Proteinbindetasche des PBP 2x* mit Cefuroxime als Ligand. Der weiße Kreis schließt das Serin, an welches das β -Lactam gebunden wird, und das Sauerstoffatom des geöffneten β -Lactam-Ringes ein.

(Darstellung der Atome des Liganden: C - grün, O – rot, N – blau, S – gelb; chemische Eigenschaften der Oberflächenpunkte: Akzeptor- sowie Donoreigenschaften – grün, Akzeptor – rot, aliphatisch – weiß, Donor – blau, aromatische π – orange; rote Sternchen – Wasser, **Serinreste – grau**, bei den AS sind die C – gelb). Die verwendete Proteinbindetasche stammt aus der Datenbank CAVBASE [65] PDB-Code: 1QMF

Für die Interaktion mit dem natürlichen Substrat bzw. der β -Lactam-Antibiotika sowie für die enzymatische Aktivität ist das Serin im Motiv 1 verantwortlich, was durch spezifische Mutationen im aktiven Zentrum gezeigt werden konnte [66-68].

Unterschiedliche PBP besitzen auch unterschiedliche Affinitäten gegenüber den verschiedenen β -Lactam-Antibiotika, was durch die Betrachtung des k_2/K -Wertes deutlich wird [69-77]. Dieser Wert wird aus der kinetischen Reaktion zwischen PBP und β -Lactamen bestimmt. Die allgemeine Reaktionsgleichung lautet wie folgt [78,79]:



K ist dabei die Dissoziationskonstante in mol l^{-1} , die die reversible Reaktion des Enzyms PBP (E) und des Substrates (S) (hier: β -Lactam) zu dem Komplex ES beschreibt. Die Acylierung des PBP findet in einem zweiten Reaktionsschritt statt.

Es resultiert ein PBP- β -Lactam-Konjugat (E-S), dessen Bildung durch die Geschwindigkeitskonstante k_2 [s^{-1}] beschrieben wird. Wie gut ein β -Lactam-Antibiotikum ein PBP inhibiert, beschreibt die Konstante k_2/K [$l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$]. Je größer diese Konstante ist, desto effizienter wird ein PBP durch das entsprechende β -Lactam inhibiert. Für diese Konstante liegen die Werte in einem Bereich zwischen 200 – 100.000 $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [70,71,76,77]. Die große Stabilität der PBP- β -Lactam-Konjugate beruht jedoch auf den sehr niedrigen Werten für k_3 , die in einer Größenordnung von 10^{-3} s^{-1} und niedriger liegen [80].

Das in dieser Arbeit verwendete PBP 2x* gehört zu den HMW PBP der Klasse B und zeigt hohe Affinitäten zu verschiedenen β -Lactam-Antibiotika. In Tabelle 3 sind die in der Literatur [74,75] zu findenden Konstanten k_2/K von PBP 2x* für die in der EU veterinärmedizinisch relevanten β -Lactam-Antibiotika aufgeführt.

| β-Lactam | k_2/K [$M^{-1} \text{ s}^{-1}$] |
|----------------------------------|--|
| Benzylpenicillin | 58.000 |
| Ampicillin | 67.000 |
| Oxacillin | 21.000 |
| Cefalexin | 1.400 |

Tabelle 3: k_2/K -Werte von PBP 2x* für veterinärmedizinisch relevante β -Lactam-Antibiotika

2.3.1. Plasmid pGEX-tet-PBP 2x*

Das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x*, das für die Expression des in dieser Arbeit verwendeten PBP 2x* benötigt wurde, wurde im Arbeitskreis von Frau Prof. Hakenbeck von Shawn Rachid hergestellt. Mittels PCR wurde das PBP 2x*-Gen aus dem Plasmid pCG31 amplifiziert [81]. Dieses Plasmid codiert PBP 2x* als PBP 2x-Derivat, welches das Transmembranpeptid (Aminosäuren 19 – 48) nicht mehr besitzt. Das PBP 2x*-Gen wurde zunächst in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) ligiert. In einen modifizierten Expressionsvektor pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde im Anschluss die korrekte DNA-Sequenz kloniert (siehe Abbildung 9). pGEX steht dabei als Abkürzung für „plasmid for

Glutathione-S-transferase-Expression“ und trägt eine Klonierungsstelle MCS (multiple cloning site). In diese Klonierungsstelle wurde der oben erwähnte kodierende Genabschnitt eingefügt. Dadurch wird dieser an die DNA-Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt, die schon auf dem Plasmid vorhanden ist. Bei einer Expression kommt es so zu der Bildung des Fusionsproteins aus PBP 2x* und GST, welches dann im Anschluss an die Expression mit einer PreScission™ Protease gespalten werden kann. Zusätzlich enthält das Plasmid einen tac-Promoter (Ptac) mit zugehörigem lac I Gen (lac I) und einem Replikationsursprung (pBR 322 ori). Der tac-Promoter ermöglicht dabei eine hohe mRNA-Produktion und eine gute Steuerbarkeit der Expression des PBP 2x*. Dieser Promoter wird dabei selektiv durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) aktiviert. Dabei bindet das IPTG an das lac I-Repressorprotein und dieses verliert dadurch seine Affinität für den tac-Promoter, so dass die RNA-Polymerase Zugang zum Promoter hat und das PBP-Gen transkribiert. Das pBR 322 ori (ori = „origin of replication“) ist eine Sequenz, die von der DNA-Polymerase aus *E.coli* als Startpunkt für die Replikation erkannt wird und sicherstellt, dass das Plasmid unabhängig von der genomischen DNA im Bakterium persistiert.

Ursprünglich enthielt das pGEX-6P-1-Derivat ebenfalls ein β-Lactamase-Gen, so dass transformierte Klone mit Ampicillin selektiert werden konnten. Diese Eigenschaft birgt jedoch das Risiko, dass bei der Expression Ampicillin und PBP ein Konjugat bilden. Somit würden bei der anschließenden Aufreinigung auch die Konjugate, die keine weiteren β-Lactame mehr binden können, isoliert werden. Damit dieses vermieden werden kann, wurde die Tetracyclin-Resistenzkassette aus pBR322 mit Oligonucleotiden, die *Pst*I- und *Not*I-Enden enthielten, amplifiziert und in das mit *Pst*I und *Not*I verdaute pGEX-6P-1 geklont. Dadurch wurde das β-Lactamase-Gen inaktiviert. Das resultierende Plasmid wurde als pGEX-tet-PBP 2x* bezeichnet und in *Escherichia coli* BL21 transformiert. Die Klone konnten über einen tetracyclinhaltigen Nährboden selektiert werden. Über die Verwendung der Tetracyclin-Resistenzkassette wurde das Problem der möglichen PBP-Ampicillin-Konjugate umgangen.

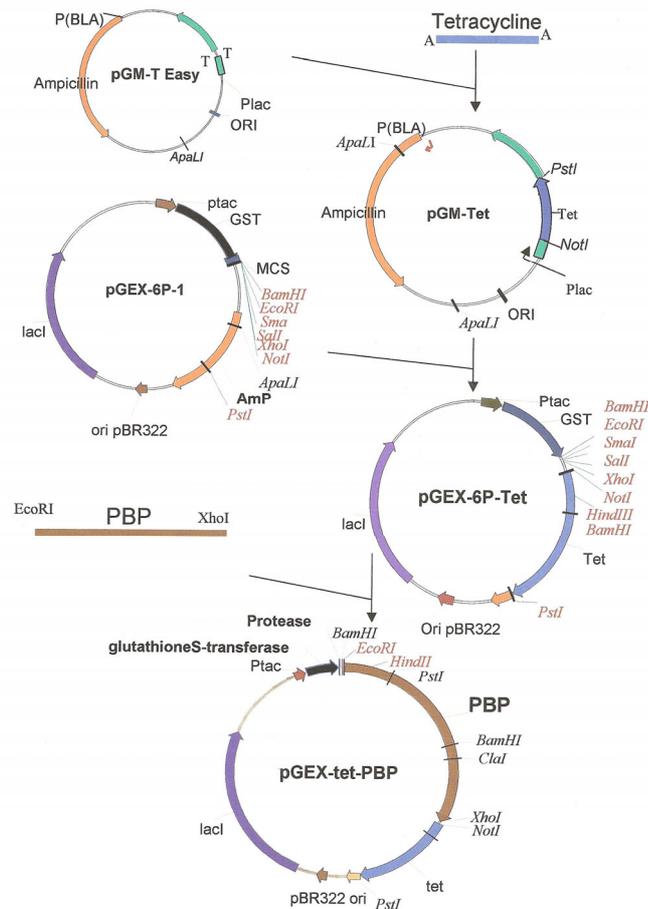


Abbildung 9: Plasmid pGEX-tet-PBP 2x* (Die Zeichnung stammt aus dem Arbeitskreis von Prof. Hakenbeck, Universität Kaiserslautern)

2.4 Resistenzbildung

Laut DIN 58940-1 von 1995 „wird ein Erreger als resistent bezeichnet, wenn die für ein entsprechendes Chemotherapeutikum ermittelte minimale Hemmkonzentration (MHK) so hoch ist, dass bei Verwendung der zugelassenen Höchstdosierung ein therapeutischer Erfolg nicht zu erwarten ist“. Bei Penicillinen und Cephalosporinen führte die sehr breite Anwendung sehr schnell zu der Entwicklung resistenter und pathogener Bakterienstämme. Die Resistenz beruht dabei auf verschiedenen genetischen und biochemischen Mechanismen. Die drei bedeutendsten Mechanismen sollen im Folgenden erläutert werden [82-84].

2.4.1. Zugangsbehinderung

Die Möglichkeit dieser Resistenzbildung ist lediglich bei gram-negativen Bakterien möglich, da das Vorhandensein einer zweiten äußeren Membran eine Diffusionsbarriere für Antibiotika bedingt. Eine Resistenzmöglichkeit, die sich ausbilden kann, ist die Expression von mutierten bzw. der Verlust von Porinen in der äußeren Membran. Auch eine vermehrte Expression von Efflux-Pumpen, die mit unterschiedlicher Spezifität Antibiotika aus der Zelle heraus transportieren, konnte beobachtet werden [85]. Eine erhöhte Expression solcher Efflux-Pumpen bewirkt jedoch nicht alleine die klinisch relevante β -Lactamresistenz. Dazu muss ein Bakterium, welches schon eine β -Lactamase bildet, eine zusätzliche Mutation erfahren, die dazu führt, dass entweder die Porinexpression reduziert oder ein Repressor, der die Pumpengenexpression steuert, inaktiviert wird [45].

2.4.2. Veränderung der Zielstruktur

Mutationen in den Genen für Transpeptidasen und Carboxypeptidasen können eine Affinität für β -Lactam-Antibiotika und damit eine Konstante k_2/K , die um den Faktor 3 - 1.000 kleiner ist, zur Folge haben [86-89]. Vor allem bei gram-positiven Bakterien konnten diese Resistenzen beobachtet werden. So kann zum Beispiel die Resistenz auf der Mutation chromosomal codierter PBP in der Nähe der konservierten Motive oder auf der Produktion zusätzlicher PBP mit verringerter Affinität gegenüber β -Lactamen beruhen [90-98].

2.4.3. Inhibierung durch β -Lactamasen

Der wichtigste Mechanismus der Resistenzbildung ist jedoch die Bildung von β -Lactamasen, welche fast zeitgleich mit dem Penicillin entdeckt wurden [99]. Diese hydrolysieren enzymatisch den β -Lactamring, welches zu der biologischen Inaktivierung der β -Lactame führt [100]. Neben zinkabhängigen Enzymen erfolgt jedoch die überwiegende Spaltung des β -Lactamrings durch Serin- β -Lactamasen über die Ausbildung eines Serinesters. Zuerst kommt es dabei zu einer Assoziation von der β -Lactamase und dem β -Lactam. Die freie Hydroxylgruppe der Seitenkette

eines Serins im aktiven Zentrum der β -Lactamase greift im Anschluss den β -Lactamring an und es bildet sich ein kovalenter Acylester. Durch die Hydrolyse des Esters werden die β -Lactamase und das nun inaktivierte β -Lactam wieder freigesetzt. Eine Einteilung der β -Lactamasen erfolgt aufgrund von homologen Sequenzen in der Primärstruktur in 4 Klassen (A-D) oder nach ihrer Funktionalität in 4 Gruppen [80,101,102]. Die Einteilung in die 4 unterschiedlichen Gruppen soll hier jedoch nicht weiter erläutert werden; es wird auf die entsprechende Literatur [102] verwiesen. Die erwähnten zinkabhängigen β -Lactamasen gehören dabei zur Klasse B und können durch EDTA inhibiert werden, die Serin- β -Lactamasen bilden die Klassen A, C und D und weisen dieselben drei konservierten Motive im aktiven Zentrum wie die PBP auf. Auch hier findet die Bindung an das Motiv 1 statt, so dass eine phylogenetische Verwandtschaft von PBP und β -Lactamasen vermutet wird [56,103-106]. Die Effizienz β -Lactame umzusetzen ist bei β -Lactamasen jedoch wesentlich höher ($k_3 > 5.000 \text{ s}^{-1}$; $k_2/K 10^8 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [80,107].

2.5 β -Lactam-Rückstände in Lebensmitteln

Bei der Behandlung von Tieren mit Antiinfektiva zur Prophylaxe, Metaphylaxe oder Therapie werden abhängig von der Applikationsart, der galenischen Zubereitung, der Pharmakokinetik, etc. Rückstände gebildet. Für einen bestimmten Zeitraum erreichen diese Rückstände Konzentrationen in essbaren Geweben und tierischen Produkten, die als gesundheitlich bedenklich angesehen werden. Deswegen ist es wichtig, die Einsatzorte sowie die pharmakokinetischen Prozesse der entsprechenden Antiinfektiva zu kennen [108].

2.5.1. Einsatz in der Veterinärmedizin

Da es keine Dokumentationspflicht in Deutschland und der EU für den Verbrauch und die Produktion von Veterinärantibiotika gibt, liegen auch keine Zahlen für den mengenmäßigen Verbrauch an Veterinärantibiotika vor. Jedoch liegt vom BfT (Bundesverband für Tiergesundheit) eine Erhebung für 2005 vor, in der der Anteil an Antibiotika beim Verbrauch dargestellt ist.

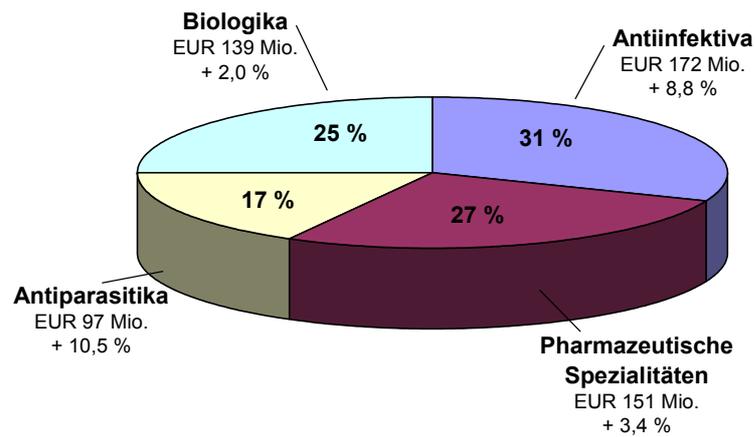


Abbildung 10: Verbrauch der Veterinärarzneimittel für Nutz- und Haustiere in Deutschland 2005 (nach BfT, 2006)

Insgesamt wurden in Deutschland 784 Tonnen Antibiotika produziert, wobei eine Abnahme beim Tetracyclineinsatz (35 t weniger als 2003) und ein deutlicher Anstieg bei den β -Lactam-Antibiotika (44 t mehr im Vergleich zu 2003) verzeichnet wurde, was bei den β -Lactamen wahrscheinlich auf den Preisverfall und dem dadurch vermehrten Einsatz der Amoxicilline zurückzuführen ist [109]. In der Veterinärmedizin spielen die β -Lactame eine sehr wichtige Rolle, da sie bei Euterentzündungen, bakteriellen Diarrhöen, Klauenentzündungen, respiratorische Erkrankungen und beim MMA-Syndrom (Mastitis, Metritis, Agalaktie) als Mittel der ersten Wahl eingesetzt werden [110]. Das Milchvieh stellt das Hauptanwendungsgebiet dar, wobei die β -Lactam-Antibiotika sehr häufig intramammär (direkte Injektion in den Euter) verabreicht werden, so dass diese Wirkstoffe folglich direkt mit der Milch ausgeschieden werden [111].

2.5.2. Rückstandsbildung – Metabolisierung und Elimination

Die Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Antibiotika ist einer der wichtigsten Punkte bei der Betrachtung der Rückstandsbildung. Sie reicht von <20 % (Benzylpenicillin) bis zu 75 % (Amoxicillin). So werden oral oder parenteral verabreichte β -Lactame an Plasmaproteine gebunden und größtenteils über die Nieren ausgeschieden, wobei auch teilweise (10-55 % der verabreichten β -Lactam-Dosis) eine Metabolisierung stattfindet. Die häufigsten Metabolisierungsformen sind bei den Penicillinen die Metabolisierung zu Penicilloinsäuren oder Penillosäuren bzw.

bei den Cephalosporinen die Metabolisierung zu Desacetylverbindungen und Lactonen [112-116]. Die Art der Verabreichung wirkt sich auf die Eliminationskinetik und damit auf die Wartezeit aus. Aber auch die langsame Wirkstofffreigabe aus den verschiedenen galenischen Zubereitungen hat einen Einfluss auf Elimination [8].

2.5.3. Rückstandsbeurteilung – Toxizität und allergenes Potential

Rein toxische Effekte spielen bei der Rückstandsbeurteilung von β -Lactam-Antibiotika keine Rolle, da sie im Allgemeinen sehr gut vertragen werden. Relevant zur Beurteilung ist jedoch das allergene Potential. So können bei allen β -Lactam-Antibiotika Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten. Dies kommt dadurch zustande, da β -Lactame sich als Haptene verhalten und die Fähigkeit besitzen Proteine zu acylieren, so dass als Folge ein Proteinamid entsteht. Dieses Proteinamid stellt dann das eigentliche Antigen für den Organismus dar und kann allergische Reaktionen auslösen, wie Exantheme, hämolytische Anämie bis zum anaphylaktischen Schock [8,108,117]. Bei den β -Lactamen sind die Penicilline die Hauptursache für Arzneimittelallergien. Grundsätzlich wirken sowohl Penicilline als auch ihre Metaboliten als Haptene. Als Major-Determinante wird dabei der Penicilloylrest bezeichnet, wobei „Major“ auf die Häufigkeit der Antikörperbildung für dieses Hapten hinweist, nicht jedoch auf die Schwere der allergischen Reaktion. Die Cephalosporine können auch Allergien auslösen, doch liegt ihre Inzidenz niedriger und die exakten chemischen Strukturen der Antigendeterminanten sind noch nicht bekannt, da die komplexe Fragmentierung beide Ringsysteme betrifft und somit mehrere Spalt- und Abbauprodukte resultieren [118].

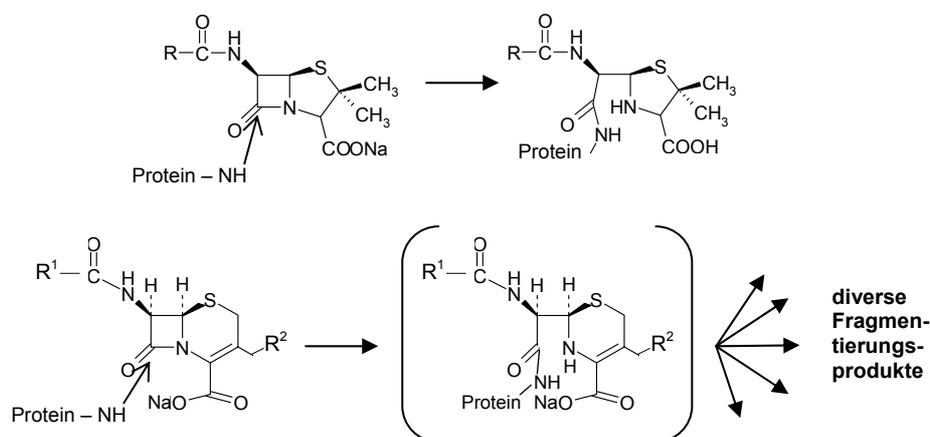


Abbildung 11: Bildung der β -Lactam-Protein-Konjugate (bei den Cephalosporinen bildet sich ein instabiles Intermediärprodukt und es folgen Fragmentierungen) (modifiziert nach [119])

So tritt eine Kreuzallergie zwischen Penicillinen und Cephalosporinen meistens nicht auf.

β -Lactam-Rückstände in Lebensmitteln können bei bereits sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine allergische Reaktion durch Nahrungsmittel ausgelöst wird, ist jedoch gering, da β -Lactam-Antibiotika-Rückstände, wenn sie im Konzentrationsbereich des festgelegten MRL-Wertes in Lebensmitteln vorhanden sind (z.B. 4-125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Milch je nach β -Lactam), immer noch in Konzentrationen weit unter den therapeutischen Dosierungsempfehlungen (1 - 2 g) vorliegen [120,121]. Aus diesem Grund werden die Rückstände in Milch hauptsächlich in Hinblick auf die Hemmung von Starterkulturen bei technologischen Prozessen beurteilt [108,122]. Das Auftreten von allergischen Reaktionen, aber auch die Beeinflussung von technologischen Prozessen bedingt eine regelmäßige Untersuchung auf Penicilline und Cephalosporine.

2.6 Regelungen zur Rückstandsbeurteilungen

In der EU gilt seit 1990 ein einheitliches Verfahren für die Festsetzung von Tierarzneimittelrückständen in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Dies gründet sich auf die Verordnung 2377/90 vom 26. Juni 1990 [2]. In den Anhängen I bis III dieser Verordnung sind die Wirkstoffe aufgeführt, die für alle lebensmittelliefernden Tiere zugelassen sind. In Anhang IV stehen die Wirkstoffe, deren Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren verboten ist.

Die Penicilline und Cephalosporine, die für die Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassen sind finden sich im kontinuierlich ergänzten Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 und sind in Tabelle 4 für die untersuchten Zielgewebe und Tierarten aufgeführt. Nach § 10 LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) dürfen vom Tier gewonnene Lebensmittel nicht gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht werden, wenn diese Rückstandsmengen oberhalb der festgelegten MRL-Werte enthalten. Auch dürfen nach § 10 Absatz 3 LFGB Lebensmittel von einem Tier nur gewonnen und in den Verkehr gebracht werden, wenn die festgesetzten Wartezeiten eingehalten worden sind.

| Antibiotikum | Marker-Rückstand | Tierart | Milch | Muskel |
|-------------------------|---|---------------------------|----------------|-----------------|
| Amoxicillin | Muttersubstanz | alle Arten | 4 | 50 |
| Ampicillin | Muttersubstanz | alle Arten | 4 | 50 |
| Benzylpenicillin | Muttersubstanz | alle Arten | 4 | 50 |
| Cloxacillin | Muttersubstanz | alle Arten | 30 | 300 |
| Dicloxacillin | Muttersubstanz | alle Arten | 30 | 300 |
| Nafcillin | Muttersubstanz | Rinder | 30 | 300 |
| Oxacillin | Muttersubstanz | alle Arten | 30 | 300 |
| Phenoxymethylpenicillin | Muttersubstanz | Schweine, Geflügel | _ [#] | 25 |
| Cefacetril | Muttersubstanz | Rinder | 125 | - [*] |
| Cefalexin | Muttersubstanz | Rinder | 100 | 200 |
| Cefalonium | Muttersubstanz | Rinder | 20 | - [*] |
| Cefapirin | Summe von Cefapirin und Desacetyl-Cefapirin | Rinder | 60 | 50 |
| Cefazolin | Muttersubstanz | Rinder, Schafe, Ziegen | 50 | - ^{**} |
| Cefoperazon | Muttersubstanz | Rinder | 50 | - [*] |
| Cefquinom | Muttersubstanz | Rinder, Schweine, Equiden | 20 | 50 |
| Ceftiofur | Summe aller den β -Lactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessenen Rückstände | Rinder | 100 | 1000 |

Tabelle 4: MRL-Werte der in dieser Arbeit untersuchten β -Lactame und Zielgewebe in $\mu\text{g}/\text{kg}$.
[#]nur für Schweine und Geflügel (nicht für Tiere, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind) zugelassen und in Anhang 1 der VO (EWG) Nr. 2377/90 aufgeführt * Diese Stoffe finden sich für Rinder im Anhang II der VO (EWG) Nr. 2377/90 ** wie * nur zusätzlich für Schafe und Ziegen

2.7 Analytik von β -Lactam-Antibiotika

Heutzutage gibt es eine Vielzahl von Analysenverfahren zum β -Lactam-Nachweis. Dazu zählen sowohl die Screening-Verfahren, die eine Ja/Nein-Entscheidung erlauben und mit denen häufig auch eine Substanzklassifizierung erfolgen kann, als auch die chemisch-physikalischen Verfahren, die eine eindeutige Identifizierung der Rückstände erlauben.

2.7.1. Screening-Methoden

Es stehen zum Screening auf β -Lactame eine Reihe sensitiver und kommerziell erhältlicher Testsysteme zur Verfügung. Diese zeichnen sich durch ihre einfache Durchführung und Auswertung und zusätzlich durch den hohen Probendurchsatz und geringen Kostenaufwand aus. Zudem wird nur eine geringe Probenaufarbeitung benötigt. Oft eignen sie sich für den Routineeinsatz und für die Identifizierung von positiven Proben vor Ort. Ein Nachteil dieser Screening-Methoden ist jedoch, dass eine Differenzierung z.B. einzelner β -Lactame nicht möglich ist und bei positiven Resultaten diese durch chemisch-physikalische Analysemethoden bestätigt werden müssen. Im Folgenden sollen die einzelnen Testsysteme näher beschrieben werden.

2.7.1.1. Mikrobiologische Hemmstofftests

Die mikrobiologischen Hemmstofftests beruhen auf der Wachstumshemmung von Mikroorganismen. Dabei werden die Proben auf ein mit Bakterien (meistens wird bei Analysen von Milch als Keim *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* aufgrund der hohen Empfindlichkeit eingesetzt) beimpftes Nährmedium gegeben und inkubiert. Die Detektion erfolgt anschließend visuell (Entstehung eines Hemmhofes oder Farbumschlag, wenn dem Testmedium ein Indikatorfarbstoff zugesetzt wurde). Kommerziell erhältliche Testsysteme sind der BRT-Hemmstofftest [123], Delvotest [124], Copan Milk Test [125], Eclipse [126], BR-Test (Milch) [127], Premi Test (Fleisch) [128] und der CowSide Test (Milch) [129]. Dabei ist der Brillantschwarz-Reduktionstest der bekannteste Vertreter unter den Hemmstofftests. Dieser Test enthält den Redoxindikator Brillantschwarz. Bei positiven Proben wird das

Bakterienwachstum gehemmt, so dass das Medium blau-schwarz bleibt. Sind keine Antibiotika vorhanden, kann das Bakterium wachsen und die entstehenden Stoffwechselprodukte reduzieren das Brillantschwarz zu seiner gelben Stufe [130]. Beim Delvotest sorgt die Säureproduktion des wachsenden Bakteriums für einen Farbumschlag des dem Medium zugesetzten pH-Indikators Bromkresolpurpur von violett nach gelb [131].

Alle Hemmstofftests haben jedoch den Nachteil, dass keine Unterscheidung der einzelnen Antibiotikaklassen möglich ist. Um eine Unterscheidung zu ermöglichen müssten für β -Lactam-Antibiotika zum Beispiel β -Lactamasen hinzu gegeben werden. Nach dem Zusatz dürfte dann keine Hemmung des Bakterienwachstums mehr erfolgen, da die β -Lactame biologisch inaktiviert worden wären.

2.7.1.2. Immunchemische Testsysteme

Das Prinzip der immunchemischen Tests beruht auf der Bildung von Antigen/Antikörper-Komplexen. Die Komplexe werden im Anschluss durch markierte Reagenzien visualisiert, wobei entweder Antikörper oder Antigene markiert werden. Zur Markierung dienen dabei Enzyme, wie zum Beispiel die Meerrettichperoxidase (EIA = Enzymimmunoassay), radioaktive Isotope (RIA = Radioimmunoassay) oder fluoreszierende Substanzen. Für den Nachweis von Penicillinen ist seit April 2006 ein ELISA kommerziell erhältlich [132]. Ein ELISA ist ein „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“, bei dem einer der Reaktionspartner an ein Trägermaterial, wie z.B. eine Kunststoffoberfläche von Mikrotiterplatten, immobilisiert wird. Überschüssige Reagenzien werden durch Waschschriffe abgetrennt, so dass der Gleichgewichtszustand der gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe erhalten bleibt und eine exakte Messung dieser Komplexe möglich ist [133]. Mit den in dem kommerziell erhältlichen ELISA eingesetzten Penicillin-spezifischen Antikörpern ist es jedoch nicht möglich Cephalosporine nachzuweisen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch kein Mikrotiterplatten-Test für den Nachweis von β -Lactam-Antibiotika auf dem Markt.

2.7.1.3. Rezeptortests

Für Screening-Tests auf β -Lactam-Antibiotika werden PBP als spezifische Bindungskomponenten eingesetzt, da diese in der Lage sind sowohl Penicilline als auch Cephalosporine als Rückstände in Lebensmitteln nachzuweisen. Die Grundlage hierfür ist die Fähigkeit der β -Lactame mit den PBP Konjugate auszubilden, wie in 2.2.3 und 2.3 beschrieben. Das Prinzip der Rezeptortests, die auch als Protein-Bindungstests bezeichnet werden, ist eng verwandt mit den bekannten immunchemischen Verfahren, wie ELISA oder RIA, jedoch werden diese nicht den immunchemischen Verfahren zugeordnet, da keine Antikörper als Bindungspartner verwendet werden.

Kommerziell erhältliche Tests sind unter anderem der Beta-Star-Test, ein Streifentest, der als Detektionsprinzip gold-markiertes PBP und immobilisiertes β -Lactam verwendet [134] sowie der Charm II-Test, der dem RIA sehr ähnlich ist und ein radioaktiv markiertes Penicillin und Bakterienpräparationen als Rezeptoren verwendet [135] und der Charm ROSA Streifentest [136]. Desweiteren sind der Delvo-X-Press zu nennen, ein Röhrchenschnelltest, der ein enzym-markiertes PBP und immobilisiertes β -Lactam benutzt [1,137] und der Snap-Test, ein Filtrationstest mit demselben Detektionsprinzip wie der Delvo-X-Press [1,138]. Zwei Prinzipien sind bei diesen Tests zu unterscheiden. Zum einen konkurrieren Rückstände in der Probe und markierte β -Lactam-Antibiotika um die Penicillin-Bindestellen der immobilisierten PBP oder es konkurrieren Rückstände und immobilisierte β -Lactam-Antibiotika um zugegebene markierte PBP.

Ein Sonderfall unter den Rezeptortests ist der Penzym-Test. Dieser Test ist ein enzymatischer Test, da hiermit die enzymatische Aktivität der DD-Carboxypeptidase nachgewiesen wird. Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Abspaltung des terminalen D-Alanins aus dem Tripeptid $N\alpha, N\epsilon$ -(Acetyl)₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Nach der Abspaltung reagiert das D-Alanin mit einer D-Aminosäureoxidase zu Wasserstoffperoxid und Pyruvat. Eine Peroxidase setzt dann in einer dritten Reaktion das gebildete Wasserstoffperoxid mit einem Chromogen zu einem orangefarbenen Farbstoff um. Eine Inhibierung der DD-Carboxypeptidase, zum Beispiel durch

β -Lactame aus der Probe, verhindert den ersten Reaktionsschritt, so dass kein D-Alanin freigesetzt wird und kein Farbumschlag erfolgt [139].

Neuere Entwicklungen sind die Nachweisverfahren mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz- (SPR-) Biosensoren zur Analytik von β -Lactam-Antibiotika in Milch [140,141]. Diese Tests erwiesen sich als sehr anfällig gegenüber Matrixinterferenzen und wurden bisher nicht kommerzialisiert.

2.7.1.4. Zusammenfassung der Screening-Tests

Screening-Tests eignen sich sehr gut für die Untersuchung großer Probenserien, da nur eine geringe Probenaufarbeitung nötig ist, sie schnell und einfach durchführbar und geringe Rückstandsmengen nachweisbar sind. Eine Zusammenstellung kommerziell erhältlicher Screening-Tests findet sich in der Broschüre der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), die von der Arbeitsgruppe „Pharmakologisch wirksame Stoffe“ der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (Fachgruppe in der GDCh) erstellt worden ist [142]. Nachteile sind jedoch, dass keine Unterscheidung einzelner Antibiotika oder Antibiotikagruppen und keine Quantifizierung möglich ist. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es zudem noch keinen rezeptorproteingestützten Screening-Test auf β -Lactam-Antibiotika im Mikrotiterplattenformat, mit dem eine Vielzahl von Proben parallel auf Penicilline und Cephalosporine untersucht werden können. Es gibt zwar zurzeit einen ELISA auf Penicilline, jedoch ist es mit diesem Test nicht möglich, auch die Cephalosporine zu detektieren, was in der Routineanalytik von Nachteil ist, da somit kein Ausschluss der β -Lactam-Anwesenheit möglich ist.

2.7.2. Chemisch-physikalische Methoden

Um eine Probe aufgrund ihres Rückstandgehaltes rechtlich beanstanden zu können, sind amtliche Kontrolllaboratorien dazu verpflichtet, positive Screening-Befunde durch chemisch-physikalische Bestätigungsmethoden, die eine Identifizierung und Quantifizierung erlauben, abzusichern [143].

Für Methoden auf der Grundlage der Dünnschichtchromatographie [144], Gaschromatographie [145] und Kapillarelektrophorese [146] sei auf die Übersichtsartikel [147,148] verwiesen. Klassische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Verfahren (HPLC = engl. high performance liquid chromatography) mit optischen Methoden zur Detektion (UV-, Diodenarray-, Fluoreszenzdetektion) sind beispielhaft in der aufgeführten Literatur [149-153] beschrieben.

Diese Verfahren sind jedoch durch die HPLC als Trennverfahren und der MS/MS zur Detektion abgelöst worden [148,154,155]. Die Vorteile der massenspektrometrischen Detektion liegen in der sehr hohen Empfindlichkeit, der hohen Selektivität und der Möglichkeit des Nachweises ohne vorausgegangene Derivatisierung. Meistens werden bei der LC/MS C18-Phasen als stationäre Phasen zur Analytik eingesetzt. Eine Ausnahme bildet die Arbeit von Becker et. al., die eine Phenyletherphase für die flüssigchromatographische Trennung beschreibt [156]. Für die Ionisation wird die Electrospray Ionization (ESI) eingesetzt. Als Massenanalysatoren finden sich hauptsächlich Triple-Quadrupol-Geräte, aber auch Ionen-Fallen (Ion-Trap). In der Literatur [156-162] finden sich einige Beispiele für entwickelte LC/MS-MS Verfahren.

3. Grundlagen der chemometrischen Optimierung

3.1 Schrittweise Optimierung

Eine chromatographische Trennung oder die Optimierung anderer analytischer und chemischer Verfahren wird im Allgemeinen schrittweise vorgenommen, indem ein Parameter nach dem anderen optimiert wird. Diese Art der Optimierung bezeichnet man auch als OVAT-Methode (one-variable-at-a-time). Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig und hat unter anderem noch den Nachteil, dass das Optimum, wenn zum Beispiel ein Parameter von einem anderen abhängig ist, verfehlt wird. Das „wirkliche“ Optimum kann dann nur durch die gleichzeitige Variation aller Parameter ermittelt werden (multivariate Optimierung). Dazu dienen zum Beispiel simultane Optimierungsmethoden, die auf faktoriellen Experimenten beruhen. Auf sequentielle Optimierungsmethoden soll im Folgenden nicht eingegangen werden, da diese nicht zur Optimierung des Testsystems verwendet wurden. Es sei jedoch auf die Literatur [163,164] verwiesen, in der beide Vorgehensweisen nebeneinander abgehandelt werden.

3.2 Simultane Optimierung

Bei simultanen Optimierungsmethoden werden mehrere Faktoren gleichzeitig variiert, wobei für jeden Parameter nur begrenzte Anzahlen von Einstellungen oder Stufen (levels) existieren. Es werden dabei die Screening-Designs (Versuchspläne zu Screening-Zwecken) und Optimierungs-Designs (Versuchspläne zu Optimierungs-Zwecken) unterschieden.

3.2.1. Screening-Designs

Screening-Designs dienen dazu, aus der Vielzahl der Parameter die ein Analysenverfahren beeinflussen können, die Parameter herauszufinden, die einen signifikanten Einfluss auf das Testsystem haben. Aus diesem Grund werden zu Beginn möglichst alle Parameter in das Screening-Design integriert, die einen Einfluss auf das Testsystem haben können. Je nachdem wie präzise die Parameter

gescreent und ihr Einfluss auf den Response beschrieben werden soll, muss das entsprechende Design ausgewählt werden. Die häufigsten Designs sind das Full Factorial Design und das Fractional Factorial Design. Auf Spezialfälle faktorieller Designs wie zum Beispiel das Plackett-Burmann-Designs, etc. soll hier nicht näher eingegangen werden, sondern es sei auf die Literatur [164-167] verwiesen.

3.2.1.1 Full Factorial Design

Das Full Factorial Design ist ein vollständiger Versuchsplan, bei dem jeder Parameter auf einen niedrigen und einen hohen Wert gesetzt wird und so viele Experimente durchgeführt werden, dass alle möglichen Kombinationen von Faktorstufen abgedeckt sind [167]. Mit einem Full Factorial Design können sowohl Haupteffekte als auch Interaktionen untersucht werden. Die Zahl der Experimente bei einem zweistufigen Full Factorial Design ergibt sich aus 2^k , wobei 2 die Faktorstufenzahl angibt und k die Anzahl der Parameter. Aus vier verschiedenen Parametern ergeben sich demnach 16 Experimente, 6 Parameter erfordern schon 64 Experimente und 7 Parameter fordern 128 Experimente, etc.

3.2.1.2 Fractional Factorial Design

Um bei mehreren Einflussparametern die Zahl der Experimente niedrig zu halten, kann man sich eines Fractional Factorial Designs (teilweise faktorieller Versuchsplan) bedienen [165,166]. Hierbei werden nicht alle Wechselwirkungen einzeln untersucht, da angenommen wird, dass Wechselwirkungen zwischen 3 und mehr Parametern unwahrscheinlich sind und bei ihrem Auftreten ihr Effekt, verglichen mit den Haupteffekten, eher klein ist. Somit wird die erforderliche Zahl der Experimente durch die Zahl p reduziert (2^{k-p}). Dieses ist die so genannte Reduktion des Designs. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das Screening ein Fractional Factorial Design, Resolution (Auflösung) IV verwendet. Deshalb soll auf diesen Typ des Screening Designs hier näher eingegangen werden. Um ein Fractional Factorial Design mit der Auflösung IV zu bilden, werden Platzhalter (generators) eingesetzt. Die Reduktion p entspricht dabei der Anzahl der verwendeten Platzhalter. Bei einem 2^{6-2} Fractional Factorial Design mit 2 Stufen und 6 Parametern wird die Einstellung des

Parameters E über die Einstellungen der Parameter A, B, C und die des Parameters F über die Einstellungen der Parameter B, C und D festgelegt. Die Effekte der Parameter E und F sowie der Wechselwirkung ABC bzw. BCD können somit nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Diese Vermengung nennt man „confounding“. Der beobachtete Effekt ist also eine Summe der tatsächlichen Effekte. Durch die Wahl der Platzhalter ($E=ABC$ und $F=BCD$) ergeben sich zudem Auswirkungen auf alle anderen Parameter, da die Parameter E und F auch in den Wechselwirkungen der Parameter A, B, C und D erscheinen. Es entsteht ein spezifisches Vermengungsmuster (confounding pattern). Für das hier beschriebene Beispiel ergibt sich folgendes Confounding pattern:

- 1: $A=BCE=DEF$
- 2: $B=ACE=CDF$
- 3: $C=ABE=BDF$
- 4: $D=AEF=BCF$
- 5: $E=ABC=ADF$
- 6: $F=ADE=BCD$
- 7: $AB=CE$
- 8: $AC=BE$
- 9: $AD=EF$
- 10: $AE=BC=DF$
- 11: $AF=DE$
- 12: $BD=CF$
- 13: $BF=CD$
- 14: $ABD=ACF=BEF=CDE$
- 15: $ABF=ACD=BDE=CEF$

Abbildung 12: Confounding Pattern eines Fractional Factorial Designs mit 6 Parametern

Durch die Bildung des Vermengungsmusters wird zwar die Anzahl der durchzuführenden Versuche drastisch gesenkt, jedoch geht auch ein gewisser Informationsverlust damit einher. Der Typ eines Vermengungsmusters wird, wie oben erwähnt, durch die Auflösung angegeben. Bei einer Auflösung III werden die Haupteffekte mit den 2-Parameter-Wechselwirkungen vermengt, bei Auflösung IV werden die Haupteffekte mit 3-Parameter-Wechselwirkungen vermengt. Außerdem

sind hier noch alle 2-Parameter-Wechselwirkungen miteinander vermengt (siehe obiges Beispiel).

Bei einer Auflösung V sind die Haupteffekte mit 4-Parameter-Wechselwirkungen vermengt und die 2-Parameter-Wechselwirkungen mit den 3-Parameter-Wechselwirkungen. Die Auflösung gibt also Auskunft über den Informationsverlust. Je höher die Auflösung, umso geringer ist der daraus resultierende Informationsverlust.

Mittels eines Screening Designs kann also der Einfluss der Parameter untersucht werden, und zwar, ob der Einfluss eines Parameters signifikant ist, ob er einen positiven oder negativen Einfluss auf den Response hat, ob die Parameter signifikante Wechselwirkungen untereinander haben und ob diese wiederum sich positiv oder negativ auswirken. Außerdem wird untersucht, welche Effekte insgesamt den größten Einfluss haben und ob die untersuchte Region ein Optimum beinhaltet.

3.2.1.3 Durchführung und Auswertung von Screening-Designs

Durchführung

Als erstes müssen die Parameter ausgewählt werden, die in das Screening-Design eingehen sollen. Alle anderen Parameter, die nicht in das Design einbezogen werden, sind während aller Versuche konstant zu halten. Anschließend muss der experimentelle Raum durch die Wahl der unteren und oberen Stufe jedes Parameters definiert werden.

Anhand der Anzahl der gewählten Parameter und der daraus resultierenden Experimentzahl, kann dann das geeignete Design ausgewählt werden, wobei beim Fractional Factorial Design besonders auf das Vermengungsmuster geachtet werden sollte. Ein Versuchsplan kann jedoch durch eine Reihe weiterer Versuche ergänzt werden. So bietet es sich bei einigen Experimenten an Wiederholversuche (repeated response measurements) durchzuführen, um die Reproduzierbarkeit der Messungen des Response (der Messgröße) zu überprüfen. Damit wird die Verlässlichkeit der Messwerte und somit auch des berechneten Modells entscheidend verbessert. Eine andere Methode ist die Mehrfachbestimmung der Experimente (replicates). Damit

wird der Methodenfehler (experimental error) abgeschätzt. Dies hat aber zur Folge, dass sich die Anzahl der durchzuführenden Experimente erhöht.

Die Mehrfachbestimmungen am centre point (Zentraler Punkt) ist ein Experiment, wobei alle Parameter auf ihren Mittelwert festgesetzt werden (der oberen und unteren Stufe). Diese Experimente dienen dazu, die Fehler des Modells und die Genauigkeit der Responsewertmessungen abzuschätzen und werden dann eingesetzt, wenn es nicht möglich ist Mehrfachbestimmungen aller Experimente durchzuführen. Eine weitere Aussage über eine eventuelle Krümmung der Antwortfläche, auch response surface genannt, und somit über ein eventuell eingeschlossenes Optimum, kann ebenfalls mittels der centre point-Experimente getroffen werden. Allgemein kann gesagt werden, dass umso mehr Bestimmungen am Centre Point erfolgen sollen, je höher die Anzahl der Parameter ist.

Des Weiteren sollten die Versuche in einer zufälligen Reihenfolge abgearbeitet werden. Diese Möglichkeit der Randomisierung dient dazu systematische Fehler, wie unterschiedliche Platten, Alterung von Lösungen, etc. auszugleichen. So gehen diese Fehler als zufällige Fehler in die Betrachtung der Ergebnisse mit ein und können diese nicht verfälschen.

Auswertung

Die Auswertung der Screening Designs umfasst mehrere Schritte [166,168]. Folgende Oberpunkte sind dabei besonders erwähnenswert:

- a) Berechnung der Effekte der ausgewählten Parameter und ihrer Wechselwirkungen
- b) Ermittlung des experimentellen Fehlers
- c) Überprüfung der Signifikanz der Effekte
- d) Modellüberprüfung

Im nachfolgenden sollen nur die zur Auswertung herangezogenen Verfahren ausführlicher erläutert werden.

a) Berechnung der Effekte (ANOVA)

In den meisten Fällen erfolgt eine Berechnung der Effekte der ausgewählten Parameter und ihrer Wechselwirkungen mittels einer Varianzanalyse, auch als ANOVA (Analysis of Variance) bezeichnet. Bei dieser Analyse wird aus den Differenzen der erhaltenen Messwerte zwischen den oberen und unteren Stufen der Parameter der Absolutbetrag berechnet. Ergibt sich dabei ein negativer Wert, so hat ein Parameter einen negativen Einfluss auf den Response. Wird der Wert positiv, so sollte der zugehörige Parameter auf hohe Werte gesetzt werden, wenn eine Erhöhung des Responsewertes erzielt werden soll.

Mathematisch werden dazu alle Responsewerte, bei dem zum Beispiel der Parameter A auf der oberen Stufe festgesetzt war addiert und anschließend gemittelt. Von diesem Ergebnis wird dann der entsprechend ermittelte Responsewert für die untere Stufe subtrahiert. Analog dazu wird dann der mittlere Effekt (mean effect) berechnet. Hierbei werden alle Responsewerte für einen Parameter addiert und anschließend gemittelt.

b) Ermittlung des experimentellen Fehlers

Eine Abschätzung des experimentellen Fehlers ist durch mehrere Methoden möglich. Die Durchführung von Wiederholexperimenten ist dabei die verlässlichste Methode, den experimentellen Fehler der Methode abzuschätzen. Andere Möglichkeiten wären die HOIE-Methode (higher order interaction effects), die aber im Falle von Fractional Factorial Designs vielfach nicht eingesetzt werden können, da hier die Wechselwirkungen höherer Ordnung meist mit Haupteffekten (also Effekten niederer Ordnung) vermengt sind und somit nicht genügend Freiheitsgrade zur Verfügung stehen. Näheres dazu siehe in der entsprechenden Literatur.

c) Überprüfung der Signifikanz der Effekte

Die Effekte können zum einen mittels der Betrachtung der p-Werte (p-value) auf ihre Signifikanz überprüft werden. Der p-Wert wird dabei mit Hilfe von Statistik-Software, wie zum Beispiel dem Unscrambler berechnet. Ein p-Wert von 0,05

(Irrtumswahrscheinlichkeit) bedeutet zum Beispiel, dass der Effekt des untersuchten Parameters mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit signifikant ist. Je kleiner also der p-Wert ist, umso signifikanter ist der entsprechende Effekt. Der große Vorteil bei der Verwendung des p-Werts als Möglichkeit die Signifikanz zu überprüfen besteht darin, dass nicht nur eine Ja-/Nein- Aussage getroffen werden kann, sondern die Signifikanzniveaus der Effekte direkt verglichen werden können. Andere Möglichkeiten die Signifikanz zu überprüfen, wären der f- oder t-Test. Auf diese Verfahren sei jedoch an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen.

Eine alternative Methode die Signifikanz zu ermitteln, ist die Möglichkeit die Effekte im Normal-B-Plot relativ zueinander zu betrachten. Dieses ist besonders dann zu empfehlen, wenn zu wenig Experimente am zentralen Punkt durchgeführt wurden und folglich die Zahl der Freiheitsgrade sehr gering ist, aber auch, wenn das System sehr präzise arbeitet und die Standardabweichungen sehr klein sind, so dass auch die resultierenden p-Werte sehr klein sind. Beim Normal-B-Plot wird nun überprüft, ob die Effekte normalverteilt sind. Weichen Effekte davon ab, werden sie als signifikant klassifiziert. Üblicherweise sind dadurch weniger Effekte signifikant als beim p-Wert, da Effekte besonders groß sein müssen, um von der Normalverteilung abzuweichen. Mathematisch werden dazu die Effekte nach ihrer Größe sortiert und durchnummeriert. Dann wird die Wahrscheinlichkeit ermittelt, dass ein Effekt solcher Größe auftritt. Diese Wahrscheinlichkeit wird dann normiert und in Prozent angegeben. Im Normalfall haben dann die Effekte Werte nahe Null.

$$P_i = \frac{100 \cdot (i - 0,5)}{T}$$

P_i : normalisierte Wahrscheinlichkeit in %

i: Rang des Effekts (liegt zwischen 1 und T)

T: Anzahl der Effekte

d) Modellüberprüfung

Die Überprüfung des Modells kann auf unterschiedlichsten Wegen erfolgen. Hier sollen jedoch nur die später verwendeten Methoden näher erläutert werden. Der

einfachste Weg ein Modell zu überprüfen, ist der Vergleich der Standardabweichungen aus den Mehrfachbestimmungen am Zentralen Punkt und der Standardabweichung aller Experimente des Designs.

Die Standardabweichung am Zentralen Punkt sollte dabei niedriger sein als die Standardabweichung aller Experimente. Liegen die Standardabweichungen in der gleichen Größenordnung bedeutet dies, dass das Modell unbrauchbar ist. Die Schwankungen, die sich aufgrund des experimentellen Fehlers ergeben sind dann von ähnlicher Größenordnung wie die Schwankungen über alle Experimente und es wird damit die Aussage getroffen, dass entweder die Analysenmethode zu unpräzise ist, um den Parametereinfluss festzustellen oder, dass die gewählten Parameter keinen Einfluss auf das Design haben. Zudem zeigt die Standardabweichung am Zentralen Punkt die Schärfe des Designs an. Je kleiner die Standardabweichung ist, desto schärfer ist das erstellte Modell.

Eine andere Möglichkeit zur Überprüfung des Modells ist die Prüfung der Korrelation. Hierbei werden die durch das Modell berechneten Werte gegen die experimentell ermittelten Werte aufgetragen. Dabei müssen nicht nur der Korrelationskoeffizient, sondern auch die Steigung (~ 1) und der Achsenabschnitt (~ 0) berücksichtigt werden.

Die Kontrolle der Residuen ist ebenfalls eine Möglichkeit, das Modell zu überprüfen. Wie schon bei den Effekten, kann auch bei den Residuen ein Normal-B-Plot graphisch dargestellt werden. Die durch das Modell nicht erklärten Residuen sollten dabei auf einer Geraden durch den Punkt (0; 50) liegen. Ist dies nicht der Fall, ist dies ein Zeichen dafür, dass in den Residuen noch Effekte enthalten sind, die durch das Modell nicht ausreichend erklärt sind.

Solche Effekte können ebenfalls erkannt werden, indem man sich ein 2D-Streudiagramm anzeigen lässt. Hierbei erfolgt die Auftragung der Y-Residuen gegen die vorhergesagten Y-Werte.

Weitere Möglichkeiten wären die Überprüfung mittels ANOVA, Goodness-of-Fit, Ausreißertest oder anhand eines reduzierten Modells.

Insgesamt lassen sich nach Durchführung eines Screening-Designs und dessen Auswertung folgende Fragen beantworten. Welche Parameter haben einen signifikanten Einfluss auf das Testsystem und haben diese einen positiven oder negativen Einfluss auf den Response? Außerdem lässt sich das gleiche für die Wechselwirkungen beantworten, nämlich welche Parameter signifikante Wechselwirkungen untereinander haben und ob sich diese ebenfalls negativ oder positiv auswirken? Die Größe des Einflusses und ob die untersuchte Region ein Optimum enthält, kann ebenfalls bestimmt werden. Danach kann entschieden werden, ob sich eine Optimierung anschließen soll. Eine solche Optimierung kann dabei nicht nur dazu dienen ein Optimum ausfindig zu machen, sondern auch die Robustheit eines Testsystems zu untersuchen, d.h. wie empfindlich die Responsewerte an bestimmten Stellen auf die Veränderung eines Parameters reagieren und welche Veränderung besonders kritisch sind und sich deutlich auf das Ergebnis auswirken.

3.2.2. Optimierungs-Designs

Mittels eines Optimierungs-Designs lassen sich sogenannte Response-Surface Modelle erstellen, wobei dieses Modell eine Art Landkarte des untersuchten Bereichs darstellt [165,169]. Damit solch ein Modell erstellt und eine Aussage über eine Krümmung der Antwortfläche möglich ist, müssen Response-Surface-Designs mindestens drei Stufen pro Parameter enthalten. Ein Optimierungs-Design arbeitet nun auch nicht mehr mit kodierten Faktorstufen (-1, 0, +1), sondern verwendet die tatsächlich eingestellten Parameter zur Berechnung. Drei Design-Typen sollen nachfolgend näher erläutert werden.

3.2.2.1 Full Factorial Designs

Dieser Design-Typ wird sehr selten eingesetzt und entsteht, wenn ein zuvor 2-stufiges Full Factorial Screening-Design um eine dritte Stufe erweitert wird. Der größte Nachteil bei solchen 3^k -Plänen ist, dass sie sehr schnell relativ viele Experimente erfordern.

3.2.2.2 Central Composite Designs

Dieser Design-Typ basiert in den meisten Fällen auf einem Fractional Factorial Design, wird jedoch vom Programm um so genannte Axiale Punkte (oder auch Sternpunkte) und einem Zentralen Punkt erweitert. Insgesamt enthält dieses Design fünf Stufen pro Parameter, die sich aus dem Zentralen Punkt, den zwei Axialen Punkten und den zwei Eckpunkten aus dem Fractional Factorial Design zusammensetzen. Die Axialen Punkte befinden sich auf dabei auf einer gedachten Kugeloberfläche und liegen somit außerhalb des Würfels. Die exakte Position der Axialen Punkte hängt dabei von der Zahl der Experimente des Factorial Designs ab.

3.2.2.3 Box-Behnken Designs

Beim Box-Behnken Design werden anstelle von Eckpunkten mittlere Punkte verwendet. Alle Punkte liegen somit im gleichen Abstand vom Zentralen Punkt auf den Kanten eines Würfels um den Zentralen Punkt. Ein Vorteil gegenüber dem Central Composite Design liegt darin, dass jeder Parameter nur auf drei Stufen eingestellt werden muss, woraus weniger Experimente resultieren. Außerdem ist die Lage der extremen Stufen besser kontrollierbar, da keine Punkte außerhalb des gewählten Bereichs (als Würfel gedacht) liegen wie es über die Berechnung durch das Programm beim Central Composite Design mit seinen Axialen Punkten der Fall ist [166,169].

3.2.2.4 Durchführung und Auswertung von Optimierungs-Designs

Durchführung

Die Durchführung eines Optimierungs-Designs erfolgt ähnlich wie bei einem Screening-Design. In einem ersten Schritt muss ausgewählt werden, welche signifikanten Parameter, die aus einem vorangegangenen Screening hervorgegangen sind, nun noch in das Optimierungs-Design eingehen. Außerdem muss der experimentelle Rahmen, in dem gearbeitet werden soll, festgelegt werden. Es sollte eine kleine experimentelle Region ausgewählt werden, damit das Design schärfer

(aussagekräftiger) wird. Experimente am Zentralen Punkt sind nun nicht mehr frei wählbar, sondern müssen durchgeführt werden, damit der experimentelle Fehler und die Krümmung des Response Surface abgeschätzt werden kann. Ansonsten entspricht, wie oben bereits erwähnt, das Optimierungs-Design einem Screening Design in der Durchführung. Auch bei der Optimierung sollte man sich für eine Randomisierung entscheiden, damit systematische Fehler ausgeglichen werden können.

Die Wahl des Design-Typs kann anhand der oben beschriebenen Merkmale erfolgen. Anzumerken ist nur noch, dass viele Parameter auch eine große Variabilität bedeuten, so dass sich die Auswertung oft schwieriger gestaltet. Deshalb ist es von Vorteil Parameter, deren Einfluss nur gering ist, zu fixieren und mit weniger Parametern bei der Optimierung zu arbeiten.

Auswertung

Der wichtigste Punkt bei der Auswertung eines Optimierungs-Designs ist die Berechnung des Oberflächenmodells (Response Surface). Diese Berechnung kann mittels Multipler Linearer Regression (MLR), Partial-Least-Squares Regression (PLS) oder der Principal Component Regression (PCR) erfolgen. Die am häufigsten verwendete Methode ist dabei die MLR, die auch von vielen Statistikprogrammen automatisch bei der Erstellung des Response Surface verwendet wird. Dargestellt werden kann dieser Response Surface Plot dreidimensional oder als zweidimensionaler Konturplot. Gemeinsam ist diesen beiden Darstellungen, dass die Abhängigkeit der Responsewerte von zwei Parametern dargestellt wird. Bei mehr als zwei optimierten Parametern müssen dann mehrere solcher Response Surface Plots ausgewertet werden [163,166,168].

Die Ermittlung der optimalen Bedingungen erfolgt dabei dann graphisch. Mathematisch ist dieses zwar auch möglich, es gestaltet sich jedoch weitaus schwieriger und kann nicht so flexibel an die jeweiligen Anforderungen angepasst werden. Im Prinzip müssen bei mehreren Parametern alle möglichen Parameterkombinationen betrachtet werden. Aus einem beliebigen Plot werden bei drei zu optimierenden Parametern graphisch die optimalen Werte von zwei Parametern ermittelt. Anschließend wird einer davon dann bei dem nächsten Plot

festgelegt und die optimalen Bedingungen für die beiden anderen Parameter abgelesen. So erhält man sehr schnell die optimalen Bedingungen aller zu optimierenden Parameter.

Die Möglichkeiten zur Überprüfung des Modells sind weitestgehend identisch mit denen des Screening-Design. Deshalb soll an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen werden. Methoden zur Überprüfung der Robustheit eines Testsystems sollen an dieser Stelle ebenfalls nicht näher erläutert werden. Auch hier sei auf die Literatur verwiesen [170-176].

4. Immunoassays (ELISA)

Die bei ELISA-Tests angewandten Arbeitsweisen stellen eine gute Grundlage für die Entwicklung eines rezeptorproteingestützten Mikrotiterplattentests dar. So läuft dieser wie ein indirekter ELISA [133] ab, jedoch wird statt des Antikörpers ein Rezeptor auf der Mikrotiterplattenoberfläche immobilisiert. Das Wirkungsprinzip beruht demnach nicht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, sondern auf einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Zur Detektion der ablaufenden Reaktion wurde auf die Meerrettichperoxidase als Marker-Enzym und eine 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-basierende Substratlösung, die gemeinsam sehr häufig bei ELISA-Tests Anwendung finden, zurückgegriffen [177]. Die Farbreaktion wurde bei dem entwickelten Mikrotiterplattentest durch die Meerrettichperoxidase, die an den verwendeten F_{ab} Fragmenten (Antikörperfragmente, die noch zur Antigenbindung fähig sind) gekoppelt war, katalysiert, wobei eine Oxidation des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch Wasserstoffperoxid (Substrat) stattfindet. Dabei entwickelt sich zunächst eine blaue Farbe, die durch das Stoppen der Enzymreaktion mit 1 M HCl in gelb umschlägt. Die zugrunde liegende Reaktion ist in Abbildung 13 dargestellt.

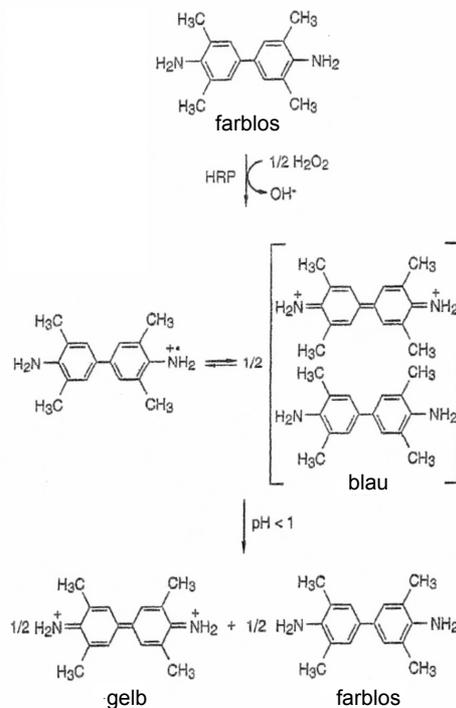


Abbildung 13: Meerrettichperoxidase-katalysierte Oxidation von TMB (modifiziert nach [177]). Die gelbe Farbe resultiert aus dem gebildeten zweifach geladenen Kation und dem farblosen ungeladenen TMB-Molekül, die nach Absenkung des pH-Wertes auf <1 aus dem zuvor gebildeten blau-gefärbten Charge-Transfer-Komplex hervorgehen.

Da auch die Auswertung des rezeptorproteingestützten Mikrotiterplattentests wie bei einem ELISA erfolgt, soll die Auswertung eines ELISA hier näher beschrieben werden. Abbildung 14 zeigt eine typische Standardkurve.

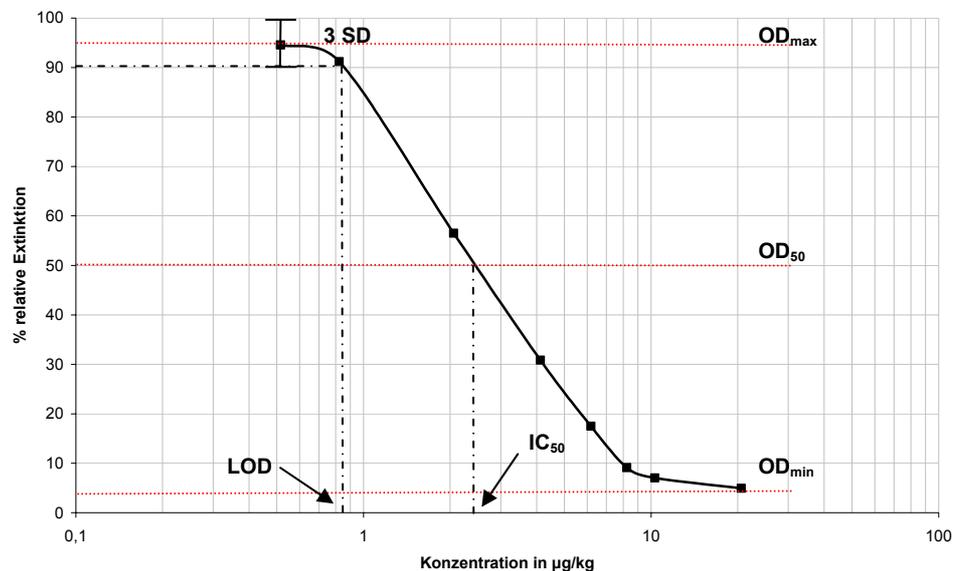


Abbildung 14: Standardkurve eines ELISA

Diese Kurve wird durch drei Absorptionswerte und zwei Konzentrationen gekennzeichnet. Der Absorptionsbereich wird dabei durch die maximale Absorption OD_{max} (optical density) und die minimale Absorption OD_{min} begrenzt. Mit Hilfe des OD_{max} kann auch die untere Nachweisgrenze, die als „limit of detection“ (LOD) definiert ist, bestimmt werden. Sie ist die Konzentration, die drei Standardabweichungen von der OD_{max} entfernt liegt [178-180]. Weitere wichtige Parameter sind der Testmittelpunkt und damit auch die Konzentration IC_{50} (inhibition concentration), die durch die OD_{50} gegeben ist. Die IC_{50} wird auch als 50 %-Wert bezeichnet und gibt den Testmittelpunkt an, an dem 50 % der Antikörperbindestellen durch Antigene besetzt sind. Die IC_{50} wird ebenfalls dazu verwendet, die Kreuzreaktivitäten (Affinität eines Antikörpers zu unterschiedlichen Antigenen), die die Spezifität des Assays angeben, zu charakterisieren.

Dazu werden die Testmittelpunkte der Standardkurven der zu untersuchenden Substanzen in folgendes Verhältnis gesetzt:

$$\text{Kreuzreaktivität in \%} = \frac{IC_{50}(\text{Vergleichsanalyt})}{IC_{50}(\text{Analyt})} * 100$$

Auf die weitere Theorie und die praktischen Anwendungsmöglichkeiten eines ELISA soll hier nicht näher eingegangen werden; es sei auf das Buch von J. R. Crowther [133] verwiesen. Auch die Arbeiten von Usleber und Märtlbauer informieren über die Anwendungsmöglichkeiten und die Einflüsse von Matrixeffekten auf einen ELISA [181-183]. Zu praktischen Problemstellungen und Lösungsmöglichkeiten sei auf die Arbeit von Schneider et al. verwiesen [184].

5. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines rezeptorproteingestützten Mikrotiterplattentests für den Nachweis von allen in der EU zugelassenen Penicillinen und Cephalosporinen in unterschiedlichen Matrices, wie Milch, Fleisch, Honig und Ei. Teil dieser Arbeit war die Expression und Aufreinigung des benötigten Rezeptorproteins, wobei diese bezüglich höherer Proteinausbeuten optimiert werden sollte. Die Synthese und Aufreinigung des markierten Penicillins als Kompetitionspartner im Mikrotiterplattentest gehörten ebenfalls dazu.

Es sollte das Penicillinbindende Protein PBP 2x*, das schon bei der Entwicklung eines SPR-Biosensor Assays verwendet wurde, eingesetzt werden, da es zwei wichtige Anforderung an den Test erfüllt. Zum einen werden mit Hilfe des PBP 2x* ausschließlich biologisch aktive β -Lactam-Antibiotika, für die auch die Rückstandshöchstmengen (MRL = maximum residue limit) festgelegt wurden, und nicht dessen biologisch inaktiven Abbauprodukte, nachgewiesen. Zum anderen zeigt das PBP 2x* sowohl ausreichende Bindungsaffinitäten gegenüber Penicillinen als auch gegenüber Cephalosporinen. Dieses ist bei Penicillin- bzw. Cephalosporin-spezifischen-Antikörpern (wie sie bei ELISA eingesetzt werden) nicht der Fall, da die Antikörper nur ausreichende Kreuzreaktivitäten innerhalb einer Klasse zeigen.

Das Testsystem sollte mittels chemometrischen Experimental Design untersucht und optimiert werden. Dabei war es wichtig herauszufinden, wie sich eine Veränderung eines einzelnen Parameters auf die Extinktionswerte auswirkt und wie robust das Testsystem bezüglich Veränderungen ist. Zudem sollten Arbeitsbedingungen ermittelt werden, bei denen ein niedriger Verbrauch des aufwendig hergestellten Reagenz bei gleichzeitig ausreichend hohen Extinktionswerten für die abschließende Farbreaktion resultiert. Anschließend sollte das so entwickelte Testsystem auf unterschiedliche Matrices angewendet werden.

Bei der Analyse von Lebensmitteln ist der Matrixeinfluss auf die Qualitätskenndaten (Sensitivität, Genauigkeit) eines Testes ein wichtiger Faktor. Es sollte deshalb überprüft werden, welchen Einfluss eine bestimmte Matrix auf das Testsystem hat

und wie dieser eliminiert werden kann, ohne dass eine aufwendige Probenaufarbeitung nötig ist.

Anschließend sollte das Testsystem angelehnt an die EU Kommissionsentscheidung 2002/657/EG, die die Validierungsprozedur für Screening-Methoden (die zur Routineanalytik der amtlichen Lebensmittelüberwachung eingesetzt werden sollen) vorgibt, für die Matrix Milch validiert werden.

Die Anwendung in der Praxis sollte zudem anhand der Analysen von Milchproben aus Medikationsstudien, die am BfEL in Kiel durchgeführt wurden, überprüft werden. Dazu sollte ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse, aus den Untersuchungen mittels Mikrotiterplattentest und Charm II-Rezeptortest sowie den Ergebnissen aus HPLC-Untersuchungen, die am BfEL ermittelt wurden, erfolgen. Dabei sollte vor allem festgestellt werden, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß das entwickelte Screening-Verfahren falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse liefert. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob sich das Testsystem auch für eine Quantifizierung, z.B. im Rahmen von Medikationsstudien, eignet.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1 Isolierung, Synthese und Charakterisierung der essentiellen Komponenten

Die Gewinnung des PBP 2x* erfolgte als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein in *E. coli* durch Überexpression. Dabei sind das GST-Protein und das PBP 2x* über das Peptid Leu-Glu-Val-Phe-Gln-Gly-Pro fusioniert. An diesem Peptid erfolgte auch die Abspaltung des GST-Proteins vom PBP 2x* mittels einer Prescission-Protease durch Spaltung zwischen Gln und Gly. Der Unterschied zwischen dem modifizierten Protein PBP 2x* und dem originären PBP 2x liegt in dem Fehlen der Aminosäuren 19-48 beim PBP 2x*, da im dazugehörigen Gen *pbp2x* die Nucleotidsequenz, die dieses Membranpeptid codiert, entfernt und damit die Wasserlöslichkeit des PBP 2x* erreicht wurde [81].

6.1.1. Bakterienanzucht / Erhöhung der Proteinausbeute

Das Bakterienwachstum gliedert sich in 4 Phasen: die „Lag Phase“ (bei Inkubation einer mikrobiellen Population in einem frischen Medium), in der das Wachstum eine gewisse Zeitspanne stagniert bevor die „Exponentielle Phase“ oder „Log Phase“ (2. Phase) beginnt, in der die Zellen wachsen und die Proteinexpression stattfindet. Anschließend folgen die stationäre und die Absterbephase. Bei der Gewinnung des PBP 2x* war es deshalb besonders wichtig, die Expression dieses Proteins in der exponentiellen Phase des Bakterienwachstums zu induzieren, um eine möglichst große Menge an Protein zu gewinnen. Das Wachstum der Bakterienzellen wurde anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) in einem Photometer verfolgt. Abbildung 15 zeigt, dass die Zugabe des die Proteinexpression induzierenden Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,65$ bzw. 0,6) zugegeben wurde, was die gewünschte verstärkte Expression des PBP 2x* verursacht hat. Dabei wurde das Bakterienwachstum mittels photometrischer Messungen verfolgt. Zwischen der Entscheidung IPTG zuzugeben (grüne Pfeile) und der eigentlichen Zugabe (rote Pfeile) vergingen jedoch immer eine gewisse Zeitspanne, da erst die photometrische Messung und die Auswertung der

Messergebnisse erfolgen mussten. Um zu wissen, wie weit das Bakterienwachstum in dieser Zeit fortgeschritten war und zu welchem exakten Zeitpunkt das IPTG zugegeben wurde, wurde eine Probe zum Zeitpunkt der Zugabe entnommen und erneut photometrisch bestimmt. Durch die Verfolgung des Bakterienwachstums anhand der optischen Dichte und der daraus resultierenden individuellen IPTG-Zugabe anstatt Zugabe bei einer festgesetzten OD (Vgl. [141] OD = 0,8; Ausbeute: 400 µg/ml) konnten die Ausbeuten an PBP 2x* gesteigert werden (Tabelle 5). Eine Online-Kontrolle würde die Verzögerung durch den Messschritt eliminieren.

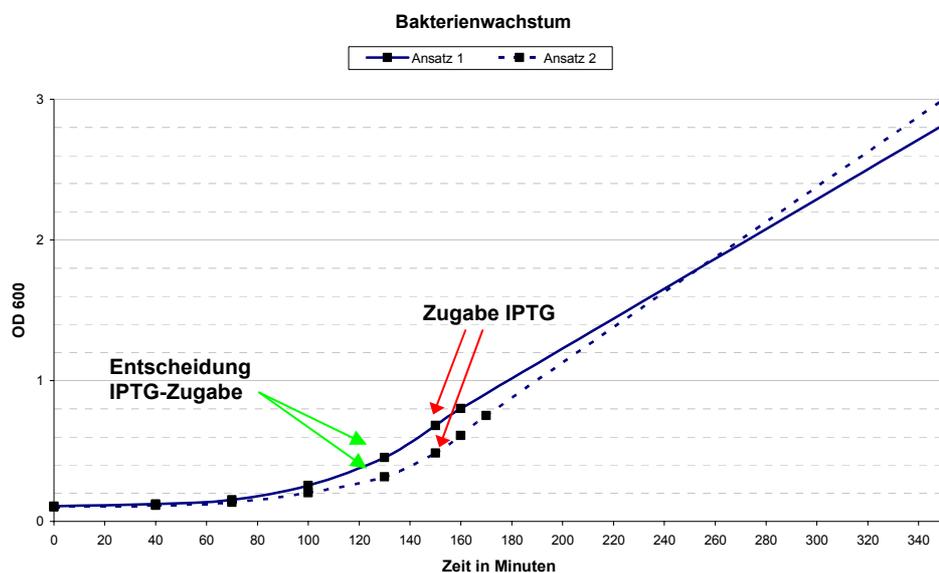


Abbildung 15: *E.coli*-Wachstum. Die grünen Pfeile zeigen den Punkt an, an dem entschieden wurde IPTG zuzugeben. Die roten Pfeile zeigen den Zeitpunkt der IPTG-Zugabe an. Die Verzögerung zwischen der Entscheidung und der eigentlichen Zugabe resultierte aus der durchzuführenden photometrischen Messung.

Der PBP 2x*-Gehalt konnte noch einmal gesteigert werden, indem nur die ersten 500 µl statt des ersten Milliliters (dieser wurde pauschal bei einer vorausgegangenen Studie im Arbeitskreis verworfen) des Eluats aus der 1. Glutathion-Affinitätschromatographie verworfen wurden. Tabelle 5 zeigt die Abhängigkeit des Proteingehalts von den durchgeführten Änderungen bei der Proteinexpression und -aufreinigung.

| | veränderte Bedingung | Proteingehalt ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------------|---|--|
| Proteingewinnung 1 | Originalvorschrift aus [141] -Induktion bei OD 0,8 und Verwurf des 1. ml aus der Affinitätschromatographie- | 533 |
| Proteingewinnung 2 | Induktion der Proteinexpression nach Beobachtung des Bakterienwachstums | 790 |
| Proteingewinnung 3 | Verwerfen der ersten 750 μl des Eluats aus der 1. Affinitätschromatographie | 1072 |
| Proteingewinnung 4 | Verwerfen der ersten 500 μl des Eluats aus der 1. Affinitätschromatographie | 1226 |

Tabelle 5: Proteingehalte der 4 durchgeführten Proteingewinnungen

Das Verwerfen von Mengen $< 500 \mu\text{l}$ wurde nicht vorgenommen, da mittels der Proteinbestimmung in den ersten 500 μl nur sehr geringe Proteinmengen ($3,8 \mu\text{g/ml}$) nachgewiesen werden konnten. Insgesamt wurde ein dreifach höherer Proteingehalt durch die modifizierte Proteingewinnung und –aufreinigung im Vergleich zu der Vorgehensweise wie sie bei Cacciatore [141] beschrieben wurde erhalten.

6.1.2. Identifizierung des PBP 2x*

6.1.2.1 Gelelektrophorese

Die Aufreinigung des PBP 2x* wurde anhand der SDS-PAGE verfolgt. Die erste Affinitätschromatographie diente dazu, das Fusionsprotein GST-PBP 2x* von den anderen Proteinen abzutrennen. Schon vor Zugabe der PreScission Protease ließen sich mittels der SDS-PAGE Zerfallsprodukte des Fusionsproteins (GST und PBP 2x*) nachweisen (Abbildung 16, Bande 2). Es zeigte sich hier schon, dass das Fusionsprotein nicht stabil ist. Nach der Zugabe der PreScission Protease und einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich die vollständige Entfernung der Bande des Fusionsproteins (ca. 102 kDa) im SDS-Gel, wobei die Bande des GST-Proteins (26 kDa) sichtbar blieb (Bande 3). Nach der zweiten Affinitätschromatographie, die dazu diente das GST-Protein vom PBP 2x* abzutrennen, konnte die Eliminierung der Bande des GST-Proteins per SDS-PAGE verfolgt werden (Bande 5). Bande 6 und 7 weisen nur noch die Bande des Zielproteins PBP 2x* auf und stellen das Ergebnis der Aufreinigung dar.

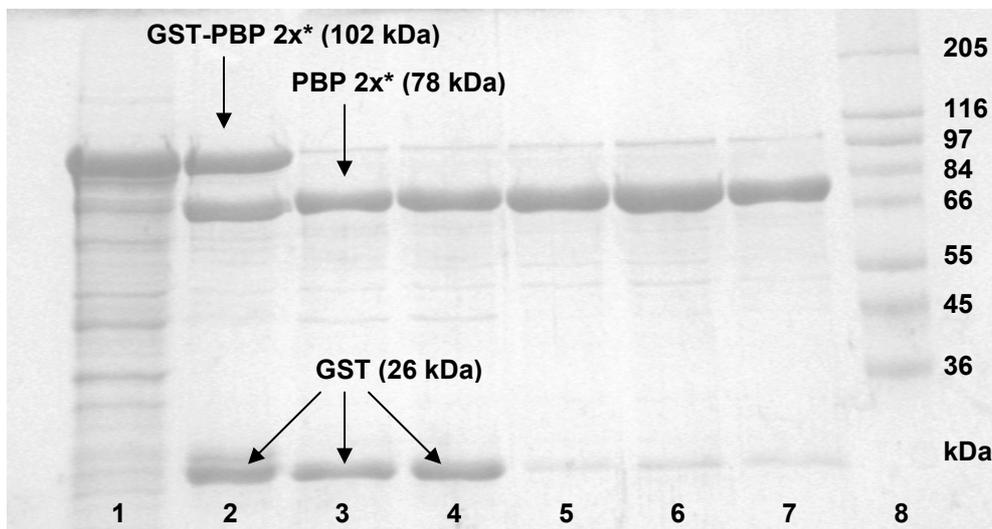


Abbildung 16: SDS-PAGE Aufreinigung des PBP 2x*. 1: Proteinfraktion nach dem Zellaufschluss; 2: Eluat aus der Glutathion-Affinitätschromatographie; 3: Eluat nach Zugabe und Inkubation der PreScission Protease; 4: Eluat nach 24 h Dialyse; 5: PBP 2x*-Lösung nach der 2. Glutathion-Affinitätschromatographie; 6 + 7: PBP 2x* in 10 %iger Glycerinlösung (unterschiedliche Auftragsmengen); 8: Molekulargewichtsstandard (Sigma high range)

Abbildung 17, Bande 6 veranschaulicht den Abbau des GST/PBP-Fusionsproteins bei Lagerung im Kühlschrank und, dass erst nach der Entfernung der Glutathion-S-Transferase (Bande 5) das PBP 2x* im Kühlschrank stabil bleibt. Somit waren eine Arbeit mit dem Fusionsprotein und eine daraus folgende Verkürzung der Aufreinigungsprozedur, wie es schon bei [141] gezeigt wurde, nicht möglich.

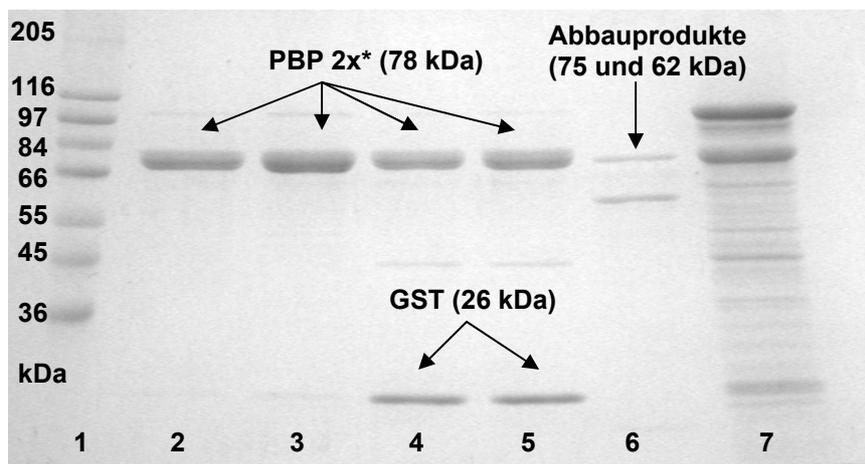


Abbildung 17: SDS-PAGE. Abbau des Fusionsproteins und des PBP 2x* (bei Anwesenheit des Fusionsproteins) im Kühlschrank. Das GST-PBP 2x*-Fusionsprotein sowie die anderen Lösungen aus der Proteinaufreinigung wurden vor der SDS-PAGE für einen Monat bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. 1: Molekulargewichtsstandard (Sigma high range); 2: PBP 2x* in 10 %iger Glycerinlösung; 3: PBP 2x* nach der 2. Glutathion-Affinitätschromatographie; 4: Eluat nach 24 h Dialyse; 5: Eluat (enthält das GST neben dem Zielprotein PBP 2x*) nach Zugabe und Inkubation der PreScission Protease; 6: Eluat (enthält das Fusionsprotein GST-PBP 2x*) aus der 1. Glutathion-Affinitätschromatographie; 7: Proteinfraktion nach dem Zellaufschluss

6.1.2.2 Gelfiltrationschromatographie

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung und gleichzeitiger Aktivitätsüberprüfung des PBP war die Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie und Fluoreszenzdetektion, wobei die Aktivitätsüberprüfung dabei nur qualitativ erfolgte. Dazu wurde wie zuvor bei [141] das Bocillin FL als fluoreszierendes Penicillin V-Derivat verwendet [185]. Die Bindung des Penicillins an das PBP 2x* konnte somit verfolgt und es konnte gezeigt werden, dass das exprimierte und aufgereinigte Protein Penicillin-bindende Aktivität besitzt (Abbildung 18 A). Die Zugabe von Ampicillin in hohen Konzentrationen verursachte eine Inhibierung des PBPs, so dass kein Bocillin FL mehr an das PBP binden konnte und somit kein PBP 2x*-Peak resultierte (Abbildung 18 B), was die Bindungsspezifität des PBP 2x* zeigte.

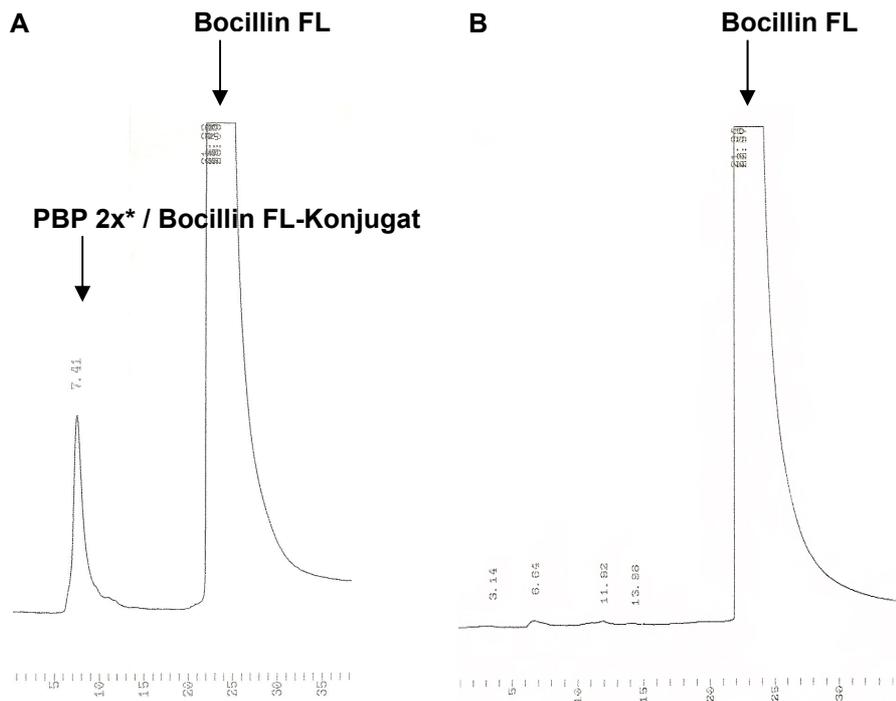


Abbildung 18: Gelfiltrationschromatographie und Fluoreszenzdetektion zur Identifikation und Aktivitätsbestimmung des PBP 2x*. A: Inkubation des PBP 2x* mit Bocillin FL; B: Inkubation des PBP 2x* mit Ampicillin vor Zugabe des Bocillin FL.

6.1.3. Lagerstabilität PBP 2x*

Das PBP 2x* war sowohl bei der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ als auch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über $2\frac{1}{2}$ Jahre stabil und zeigte sowohl in der Gelelektrophorese (Abbildung 19, 4 und 5) keinen erkennbaren Abbau als auch bei der Durchführung des Mikrotiterplattentests keinen Aktivitätsverlust durch die Gefrierlagerung (Abbildung 20).

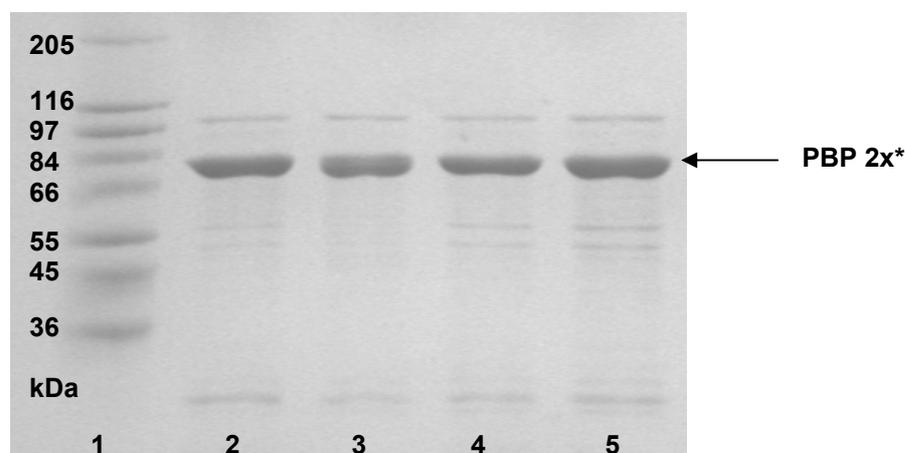


Abbildung 19: SDS-PAGE verschiedener PBP 2x*-Chargen, untersucht am 6.9.06. 1: Molekulargewichtsstandard (Sigma high range); 2: PBP 2x* vom 15.7.05, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3: PBP 2x* vom 18.10.04, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4: PBP 2x* vom 4.2.04, gelagert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5: PBP 2x* vom 4.02.04, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Bandenstärke kann nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, da die SDS-PAGE nur zur qualitativen Kontrolle eingesetzt wurde.

Bei Lagerung des PBP 2x* im Kühlschrank nahm die Aktivität jedoch nach 6 Monaten um etwa 50 % ab, was mittels der erhaltenen Extinktionswerte im Mikrotiterplattentest gezeigt werden konnte.

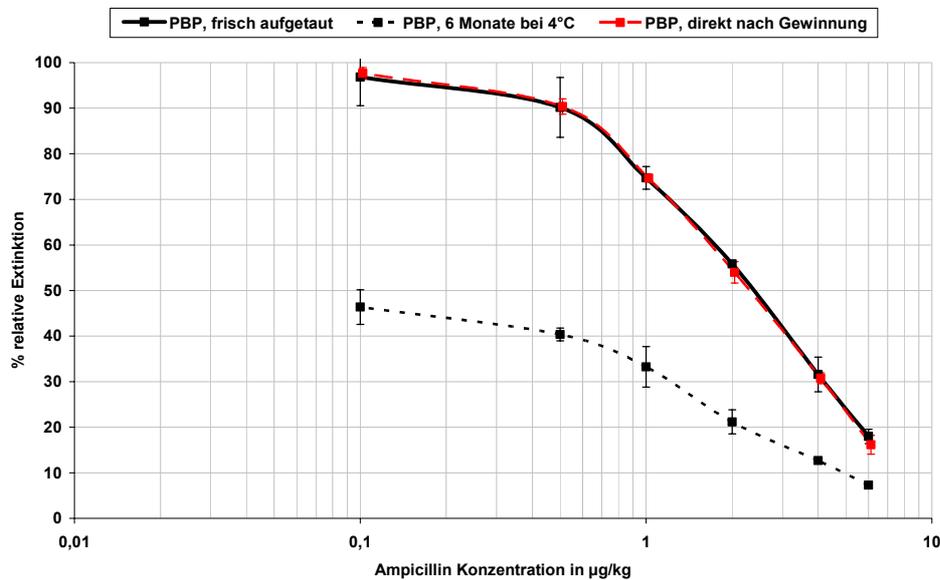


Abbildung 20: Aktivitätsverlust durch Lagerung des PBP 2x* vom 15.7.05 im Kühlschrank bei 4 °C im Vergleich zu frisch hergestelltem PBP 2x* (vom 15.7.05) und mit bei -20 °C gelagerten PBP 2x* (vom 15.7.05).

Ein wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen wirkte sich ebenfalls negativ auf die Aktivität des PBP 2x* aus. Dies konnte im Verlauf der Testentwicklung beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde das gewonnene PBP 2x* in 50- bzw. 100 µl-Aliquots in PCR-Tubes eingefroren (-20 °C) und nach dem Auftauen im Kühlschrank maximal 2 Wochen lang aufbewahrt und verwendet.

6.1.4. Synthese des Digoxigenin-markierten Ampicillin

Ampicillin wurde mit Digoxigenin markiert (DIG-AMPI), um einen Reaktionspartner für den rezeptorgestützten Mikrotiterplattentest zu erhalten. Gegen Digoxigenin sind hochaffine, markierte Antikörper bzw. antigenbindende-Antikörperfragmente erhältlich. Als Naturstoff kommt es ausschließlich in *Digitalis*-Pflanzen vor, so dass keine unspezifischen Reaktionen mit Inhaltsstoffen aus Lebensmitteln zu erwarten sind. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von DIG-AMPI lag in den schon gesammelten Erfahrungen, die bei der Entwicklung eines optischen Biosensor-Tests durch G. Cacciatore [141] mit dem DIG-AMPI gemacht wurden.

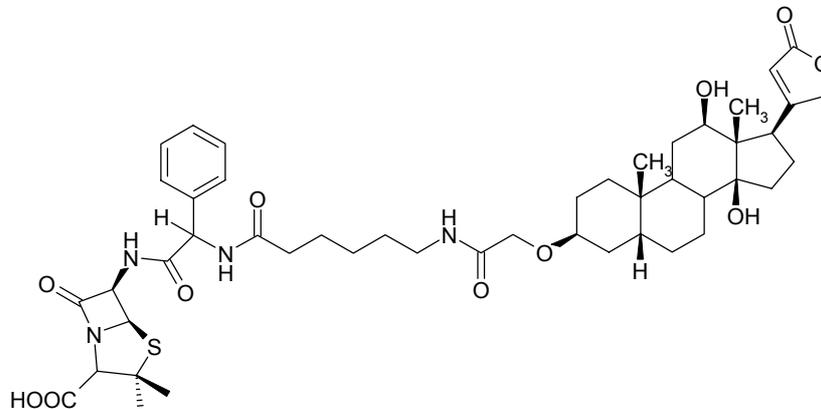


Abbildung 21: Digoxigenin-markiertes Ampicillin

Die Synthese wurde wie in 9.4 beschrieben durchgeführt. Die Identifizierung von DIG-AMPI im Eluat der HPLC erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen. Zum einen durch die Zugabe von β -Lactamase und zum anderen durch PBP 2x*-Zugabe. Bei der Zugabe des PBP entstanden PBP-/DIG-AMPI-Komplexe, was dazu führte, dass die zugehörige Fläche des DIG-AMPI-Peaks abnahm (Abbildung 22 B). Die β -Lactamase-Zugabe verursachte dagegen die Ringöffnung des Ampicillins, so dass die entstandenen polareren Ampicillosäuren früher eluierten als die intakten Digoxigenin-markierten Ampicilline (Abbildung 22 C) und somit ein zusätzlicher Peak im Chromatogramm sichtbar wurde.

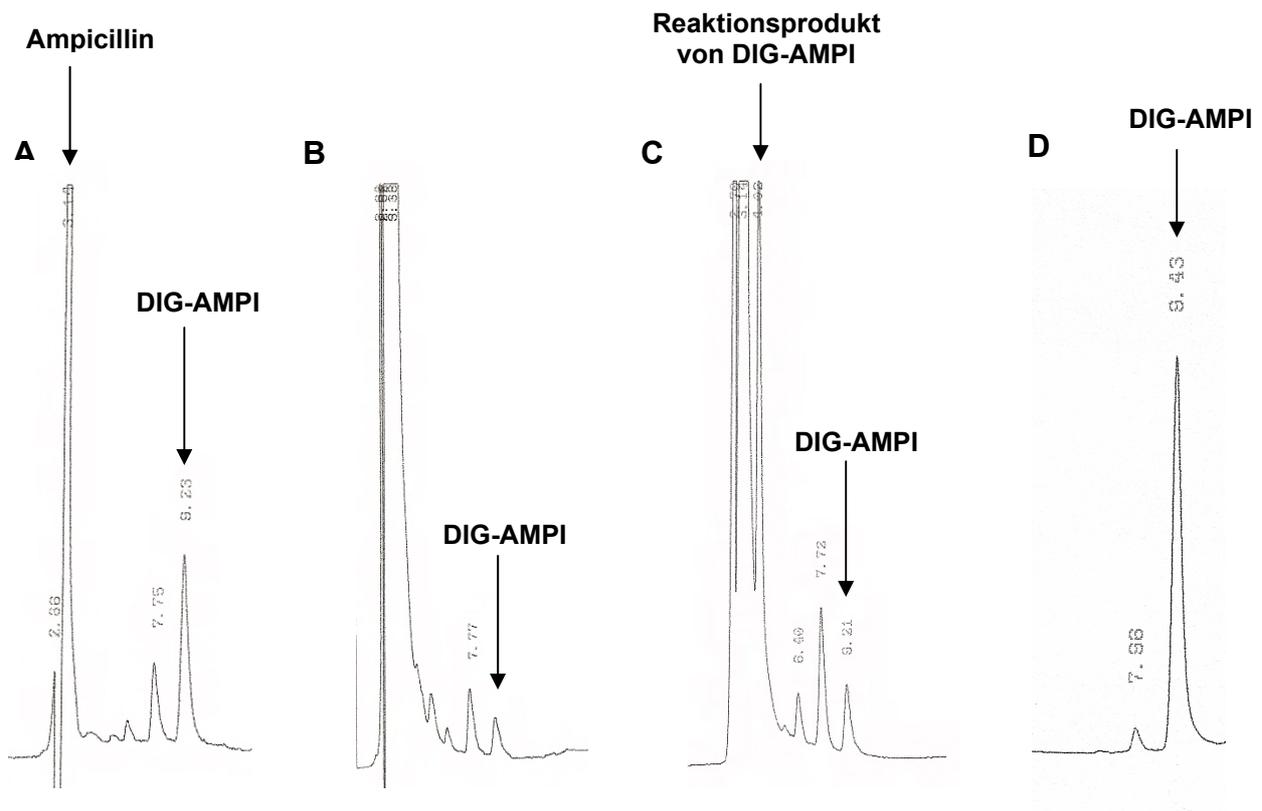


Abbildung 22: Identifizierung des DIG-AMPI-Peaks zur anschließenden Fraktionierung mittels HPLC sowie Reinheitsüberprüfung. A: Chromatogramm des Syntheseprodukts; Ampicillin kommt mit der Totzeit von der Säule; B: Chromatogramm nach Zugabe von PBP 2x* zum Syntheseprodukt → abnehmender DIG-AMPI-Peak; C: Chromatogramm nach Zugabe von β -Lactamase zum Syntheseprodukt → zusätzlicher Peak durch die entstandenen Reaktionsprodukte des DIG-AMPI und gleichzeitige Abnahme des DIG-AMPI-Peaks; D: Chromatogramm der Reinheitsüberprüfung von DIG-AMPI (Retentionszeit um 0.2 versetzt, da Integrator zu spät gestartet hat)

Nach der Identifizierung des DIG-AMPI-Peaks konnte DIG-AMPI von dem nicht umgesetzten Ampicillin und nicht umgesetzten Digoxigenin durch Fraktionierung abgetrennt werden. Nach der Fraktionierung erfolgte noch einmal eine Reinheitsüberprüfung (Abbildung 22 D), um sicherzustellen, dass keine Edukte (vor allem Ampicillin) noch im Produkt vorhanden sind und die anschließende Quantifizierung, wie unter 9.4 beschrieben, erfolgen konnte. Nicht umgesetztes Ampicillin würde das PBP inhibieren und somit die Sensitivität des entwickelten Testsystems herabsetzen. Die Konzentration wurde gemäß 9.4 zu 2378 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Im Vergleich zu Cacciatore [141] (257 $\mu\text{g/ml}$) konnte durch die Verdopplung der Menge, der zur Synthese eingesetzten Reagenzien und der Verlängerung der Inkubationszeit (Schütteln des Reaktionsansatzes bei RT über Nacht (~13 Stunden) statt für 4 Stunden) die Ausbeute an DIG-AMPI verzehnfacht werden.

6.2 Testentwicklung

Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung sowie Synthese der benötigten Reagenzien wurde der Mikrotiterplattentest entwickelt. Als Testprinzip wurde der Ablauf eines ELISA zugrunde gelegt. Jedoch findet hierbei eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung und nicht eine Antikörper-Antigen-Reaktion wie bei einem ELISA statt. Anstelle eines Antikörpers wurde das Rezeptorprotein PBP 2x* auf der Mikrotiterplattenoberfläche immobilisiert, um dessen Bindestellen die β -Lactam-Rückstände aus Standards oder Lebensmittelproben und das Digoxigenin-markierte Ampicillin konkurrieren. Die gebildeten PBP/DIG-AMPI-Komplexe wurden dann in einem nächsten Inkubationsschritt durch mit Meerrettichperoxidase markierte anti-Digoxigenin F_{ab} Fragmente besetzt. Die Detektion erfolgte photometrisch nach Zugabe der Substrat-/Chromogenlösung. Die resultierende Farbentwicklung ist umgekehrt proportional zu der β -Lactam-Konzentration in der Probe.

Zu Beginn der Arbeit war nicht bekannt, ob das PBP 2x* bei der Immobilisierung und den anschließenden Waschschrinen seine Aktivität behalten würde. Außerdem war die Spezifität der Bindung des DIG-AMPI (neben der Bindung an die PBP 2x*-Bindestellen eventuell auch noch Bindung an die mit β -Casein geblockter Mikrotiterplattenoberfläche) nicht ausreichend bekannt. Der erste Versuch zeigte jedoch schon, dass nach Immobilisierung des PBP 2x* β -Lactame und DIG-AMPI weiterhin gebunden wurden und die Durchführung des Tests wie bei einem ELISA möglich war. Außerdem zeigte ein Kontrollexperiment mit Ampicillin im Überschuss (1 mg/ml), die Spezifität der DIG-AMPI-Bindung an, da keine Extinktion gemessen werden konnte. Die Bindung des DIG-AMPI fand somit ausschließlich an die PBP-Bindestelle statt. Es ging nun in den ersten Schritten darum, die optimalen Bedingungen für den β -Lactamnachweis zu finden.

6.2.1 Mikrotiterplattenauswahl

Es standen zwei verschiedene Plattentypen der Firma Nunc zur Verfügung, MaxiSorpTM- und PolySorpTM-Platten. Beide Plattentypen weisen eine Polystyrol-Oberfläche auf. Die Unterschiede liegen in den Oberflächenmodifikationen. PolySorpTM-Platten präsentieren hauptsächlich hydrophobe Gruppen an ihrer

Oberfläche, dagegen besitzen die MaxiSorp™-Platten aufgrund der Oberflächenmodifikation neben den hydrophoben Gruppen zusätzlich viele hydrophile Gruppen, so dass ein feines Netzwerk aus hydrophoben und hydrophilen Bindestellen resultiert [186].

Abbildung 23 zeigt die Standard-Kalibrierkurven, die mittels der beiden Mikrotiterplatten und Ampicillin als β -Lactam-Antibiotikum erhalten wurden. Die OD-Werte von Standardkurven in PBS-Puffer lagen auf den MaxiSorp™-Platten im Bereich um 1,0 und zeigten gut abgestufte OD-Werte, so dass ein großer linearer Bereich der sigmoid verlaufenden Kalibrierkurve resultierte. Dagegen wiesen die PolySorp™-Platten einen kleineren linearen Bereich auf. Die roten Pfeile in Abbildung 23 markieren das Ende des linearen Bereichs. Insgesamt war der Test bei Verwendung von PolySorp™-Platten weniger sensitiv.

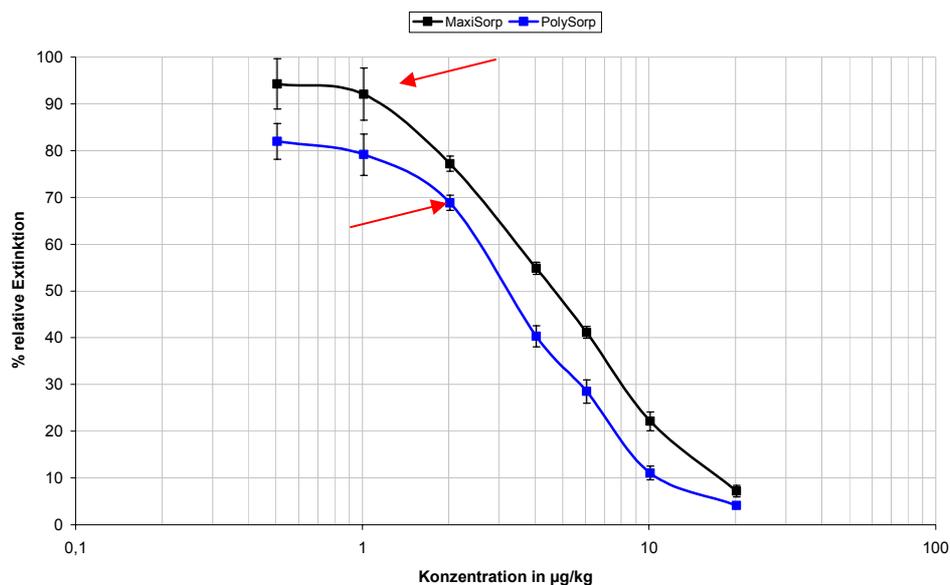


Abbildung 23: Vergleich der MaxiSorp- und PolySorp-Platten. Die roten Pfeile markieren das Ende des linearen Bereichs. (n = 3)

Polysorp™-Platten zeigen im wässrigen Medium einen abweisenden Effekt gegenüber Makromolekülen, die reich an hydrophilen Gruppen sind, da diese dazu neigen, eher mit dem Wassermolekülen starke Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden statt an die Oberfläche durch Ausbildung schwacher hydrophober Bindungen zu binden. Aber auch Makromoleküle mit vielen hydrophoben Gruppen, die nicht so fest an die MaxiSorp™-Oberfläche gebunden werden können, müssen bei PolySorp™-Platten sehr nah an die Oberfläche kommen, um die hydrophoben Bindungen ausbilden zu können [186]. Die Unterschiede im Bindungsmechanismus

erklären auch die erhaltenen Resultate. Das PBP 2x* weist sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen auf, so dass eine Bindung mittels beider Bindungstypen an die MaxiSorp™-Platten möglich ist. Es können also mehr Moleküle in der gleichen Zeit an die Oberfläche binden, als bei der PolySorp™-Platte. Möglichkeiten die Bindungskapazität des PBP an die PolySorp™-Platten zu erhöhen, wären eine Erhöhung der Beschichtungsmenge, eine längere Inkubationszeit, aber auch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur gewesen. Diese Möglichkeiten wurden jedoch nicht untersucht, da beide Plattentypen vorhanden waren und die MaxiSorp™-Platten aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit für die PBP 2x* direkt besser geeignet waren und ohne weitere Variationen der Beschichtungsbedingungen eingesetzt werden konnten. Für alle folgenden Untersuchungen wurden demnach MaxiSorp™-Platten verwendet.

6.2.2 Auswahl der Blockpuffer

Aktive Stellen der Mikrotiterplattenoberfläche müssen mit Proteinen belegt werden, um die unspezifischen Bindungen von Matrixkomponenten und Reaktionspartnern (DIG-AMPI und anti-DIG-F_{ab} Fragmente) an die Oberfläche der Mikrotiterplatte zu inhibieren. Solche Proteine werden über einen Blockpuffer aufgebracht. Drei Blockpuffer (2 %ige Casein- bzw. BSA-Lösung sowie eine synthetische Blockpufferlösung: RotiBlock) wurden auf ihre Anwendbarkeit bei dem Mikrotiterplattentest untersucht. Wie anhand der Kalibrierkurve in Abbildung 24 zu erkennen ist, wurde die Testsensitivität und die Genauigkeit ohne die Verwendung von Blockpuffer stark herabgesetzt. Der Einsatz aller verwendeten Blockpuffer reduzierte die unspezifischen Bindungen. Durch Verwendung einer 2 %igen Caseinlösung als Blockpuffer wird zudem noch eine Standardkurve mit ausreichender Steigung erhalten, so dass Abweichungen bei Mehrfachbestimmungen in Bezug auf eine Quantifizierung geringer ins Gewicht fallen.

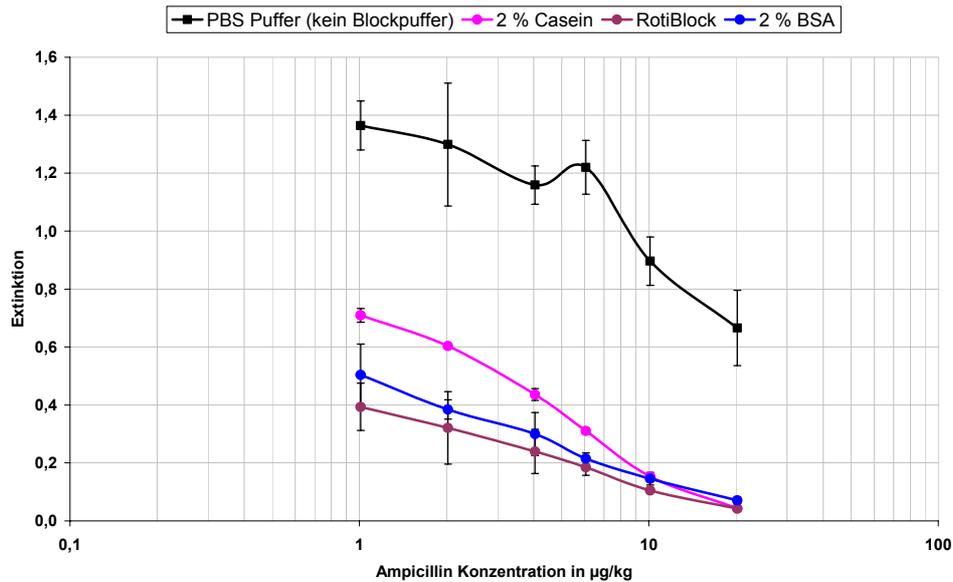


Abbildung 24: Blockpufferauswahl. Die 2%ige Casein- sowie BSA-Lösungen wurden selbst hergestellt, RotiBlock ist ein Produkt der Firma Roth (n = 3)

In Abbildung 25 ist Abbildung 24 noch einmal ohne die PBS-Kurve dargestellt, um die verschiedenen Blockpuffer besser vergleichen zu können. Aus der Verwendung von Casein als Blockpuffer resultieren geringere Standardabweichungen der einzelnen Messwerte, was auch in einem Wiederholversuch bestätigt werden konnte.

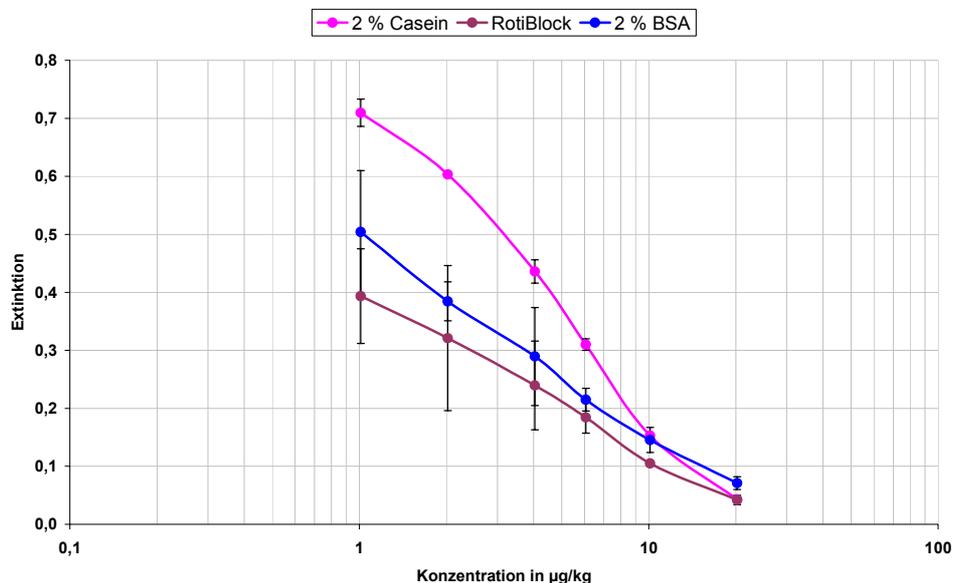


Abbildung 25: Vergleich der Blockpuffer; Darstellung ohne PBS. Die Werte bei 1 µg/kg zeigen die maximale Extinktion, die mittels des jeweiligen Blockpuffers erhalten wurde, an.

Aufgrund der starken Streuung der Messwerte bei der Verwendung von RotiBlock und 2%iger BSA als Blockpuffer und aufgrund der erhaltenen höheren

Extinktionsdifferenz (Abweichungen fallen bei Mehrfachbestimmungen in Bezug auf eine Quantifizierung geringer ins Gewicht) zwischen der geringsten und der höchsten Konzentration bei Verwendung der Casein-Lösung wurde die 2 %ige Casein-Lösung als Blockpuffer gewählt.

6.2.3 Schachbretttitration

PBP wurde gegen DIG-AMPI sowie gegen die anti-DIG-F_{ab} Fragmente titriert, um die optimalen Kombinationen hinsichtlich der Testsensitivität zu ermitteln. Die Kombinationen aus PBP-Beschichtungsmenge und DIG-AMPI sowie der anti-DIG-F_{ab} Fragmente, die einen Extinktionswert des antibiotikafreien Ansatzes um 1,0 erzielten und für den antibiotikahaltigen (B) und antibiotikafreien Ansatz (B₀) einen hohen Extinktionsunterschied (B/B₀) aufwiesen, wurden für die Erstellung der Standardkurven verwendet. Den maximalen Extinktionsunterschied und damit die höchste Testsensitivität wurde unter Einsatz von 2 µg/kg Ampicillin bei einer PBP 2x*-Beschichtungsmenge von 300 ng/Kavität, einer DIG-AMPI-Verdünnung von 1:40.000 und einer Verdünnung von 1:1.000 der anti-DIG-F_{ab}-Fragmente erreicht.

6.2.4 Simultane und konsekutive Kompetitorzugabe

Die Auswahl des Assay-Formates erfolgte, nachdem geprüft wurde, ob es günstiger ist, β-Lactam und DIG-AMPI gemeinsam (simultan) oder nacheinander (konsekutiv) in die mit PBP 2x* beschichteten Kavitäten zu pipettieren. Bei der simultanen Vorgehensweise konnte anders als bei der konsekutiven Arbeitsweise nicht zwischen den β-Lactam-Standards, die in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 µg/kg und 20 µg/kg lagen, und einem Blank (reiner PBS Puffer) unterschieden werden. Der Grund liegt in der Zugabe des DIG-AMPI im Überschuss, der gewährleisten soll, dass alle noch vorhandenen und nicht von β-Lactamen besetzten Bindestellen der PBP besetzt werden. Bei der simultanen Vorgehensweise besetzt DIG-AMPI somit sofort alle PBP-Bindestellen und das in geringerer Konzentration vorliegende β-Lactam stellt keinen Kompetitor um die Bindestellen mehr dar. Bei einer konsekutiven Vorgehensweise wird dieses Problem umgangen, da den β-Lactamen

ausreichend Zeit gegeben wird die Bindestellen zu besetzen. Erst nach einer gewissen Inkubationszeit (~30 Minuten) wurde das DIG-AMPI hinzugegeben. Durch diese Vorgehensweise konnte eine ausreichende Sensitivität erzielt werden. Kürzere Inkubationszeiten wirkten sich aus diesem Grund auch auf die Testsensitivität aus, was mittels der chemometrischen Optimierung (Kap. 6.3) gezeigt werden konnte. Eine Trennung der Inkubationsschritte durch Einfügen eines Waschschrilles zeigte bei Standardlösungen in PBS Puffer keine Verbesserung bezüglich der Sensitivität.

6.2.5 Plattenlagerung

Zur Überprüfung, ob es möglich ist die Platten nach erfolgter Beschichtung zu lagern, wurden Untersuchungen zur verbleibenden Aktivität des PBP 2x* durchgeführt. Hierzu wurden vier Platten beschichtet und dem beschriebenen Arbeitsschema folgend (Kap. 9.5.2) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden diese gemäß dem üblichen Testablauf gewaschen und mit 2 %iger Caseinlösung geblockt. Die erste Platte wurde noch am selben Tag zur Analytik von Cefoperazon verwendet, die zweite Platte am darauf folgenden Tag und die dritte Platte 2 Tage später. Die vierte Platte wurde dagegen nach dem Blocken gewaschen und entleert und bei -20°C für eine Woche eingefroren.

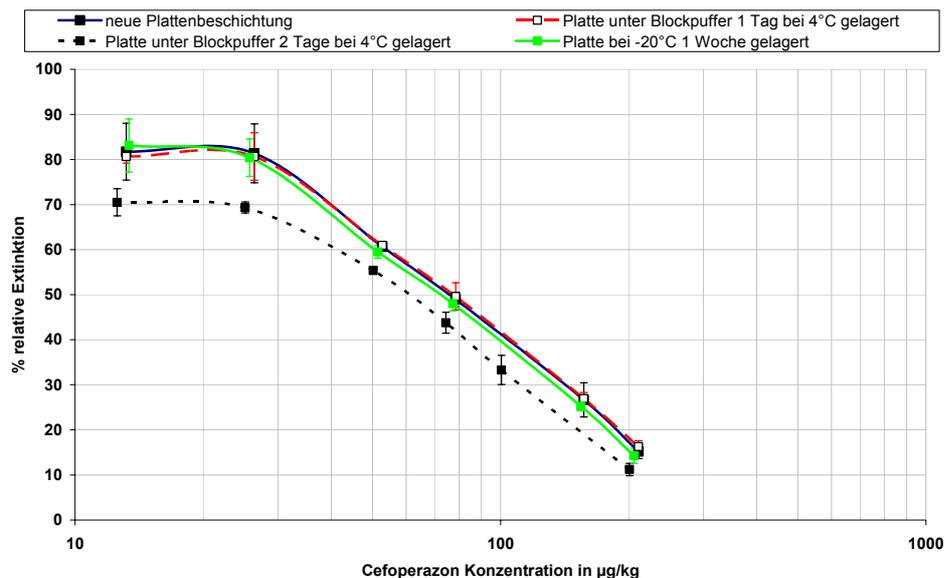


Abbildung 26: Aktivität des schon auf der Platte immobilisierten PBP 2x* nach unterschiedlicher Lagerung

Die eingefrorene Platte und die nur einen Tag im Kühlschrank gelagerte Platte lieferten dieselben Resultate wie die Platte, die sofort nach dem Blocken analysiert wurde. Lediglich die Platte, die 2 Tage unter Blockpuffer im Kühlschrank gelagert war, lieferte niedrigere Extinktionswerte. Eine längere Gefrierlagerung oder das Einfrieren unter Blockpuffer wurden nicht untersucht, da eine längere Lagerung der beschichteten Platten nicht nötig war.

6.2.6 Erarbeitetes Testprinzip

In Abbildung 27 ist das Testprinzip des entwickelten rezeptorproteingestützten Mikrotiterplattentests dargestellt. In der rückstandsfreien Probe binden die PBP ausschließlich DIG-AMPI, so dass exklusive PBP/DIG-AMPI-Komplexe gebildet werden, die dann durch die markierten anti-DIG-F_{ab} Fragmente sichtbar gemacht werden. In Gegenwart von β -Lactam-Antibiotika binden jedoch in dem ersten Inkubationsschritt diese an die PBP-Bindestellen und besetzen diese. DIG-AMPI kann nun im folgenden Schritt nur noch an die freien Bindestellen binden, so dass weniger PBP/DIG-AMPI-Komplexe resultieren, die durch die anti-DIG-F_{ab} Fragmente sichtbar gemacht werden können.

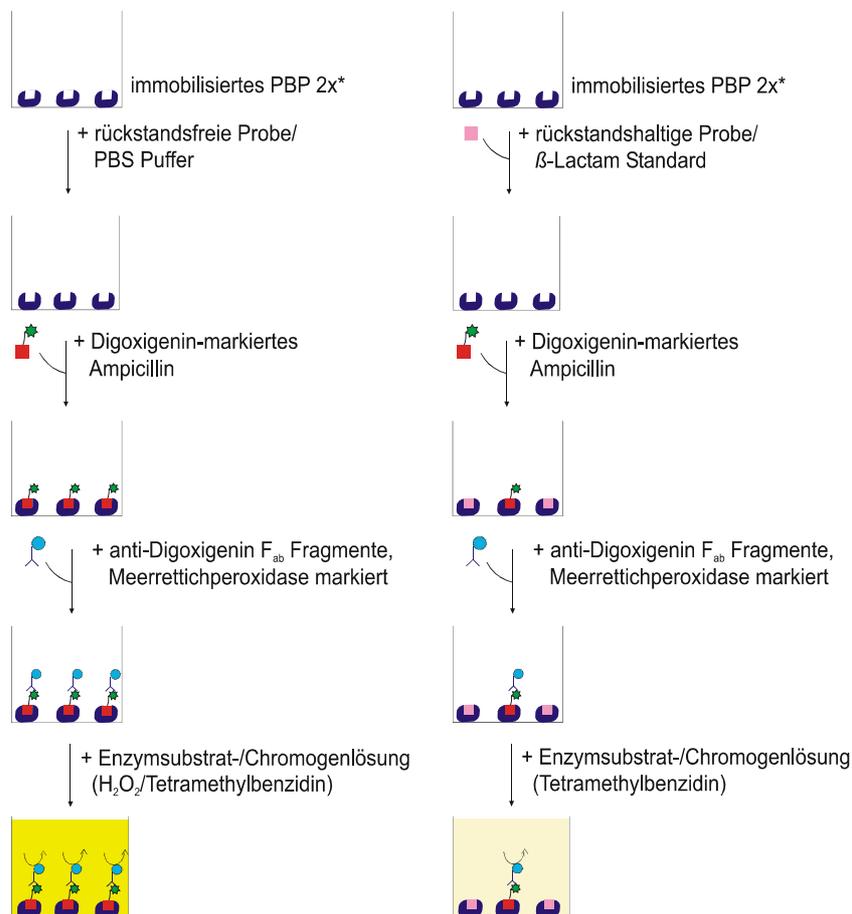


Abbildung 27: Testprinzip des Mikrotiterplattentests für den β -Lactam-Nachweis mit Hilfe von PBP 2x*, DIG-AMPI und mit Meerrettichperoxidase markierten anti-Digoxigenin F_{ab} Fragmenten. Links dargestellt ist die ablaufende Reaktion mit rückstandsfreier Probe, rechts mit rückstandshaltiger Probe. Näheres siehe Text.

Die Intensität der resultierenden gelben Farbe ist umgekehrt proportional zu der β -Lactam-Konzentration in der Probe.

6.3 Chemometrische Optimierung des entwickelten Mikrotiterplattenassays mittels Experimental Design

Die Optimierung des entwickelten Mikrotiterplattenassays sollte mit Hilfe des Experimental Design erfolgen, um eine Alternative gegenüber der sonst üblicherweise durchgeführten Schachbretttitration (Vgl. 6.2.3) aufzuzeigen.

6.3.1 Screening Design

Das Screening Design diene dazu, als erstes die Parameter ausfindig zu machen, die den stärksten Einfluss auf die resultierende Extinktion haben. Außerdem sollten eventuell auftretende Wechselwirkungen der Parameter erkannt und interpretiert werden.

6.3.1.1 Experimentelles

Dass die Umgebungstemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die resultierende Extinktion hat, war bekannt. Da jedoch mit zwei Enzymen gearbeitet wurde, dem PBP 2x* und der Meerrettichperoxidase, sollte bei der Optimierung die Temperatur bei 20°C konstant gehalten werden, um alle anderen Einflüsse besser beobachten zu können. Desto weniger Parameter ausgewählt werden, desto schärfer ist am Ende das resultierende Design.

Insgesamt wurden von den möglichen Einflussparametern sechs Parameter in das Screening integriert. In der folgenden Abbildung ist die Arbeitsvorschrift des Testsystems für die Screening- Prozedur dargestellt. Rot hervorgehoben sind dabei die ausgewählten Einflussparameter. Das Fragezeichen markiert dabei die zu optimierende Konzentration bzw. die noch zu optimierende Inkubationszeit.

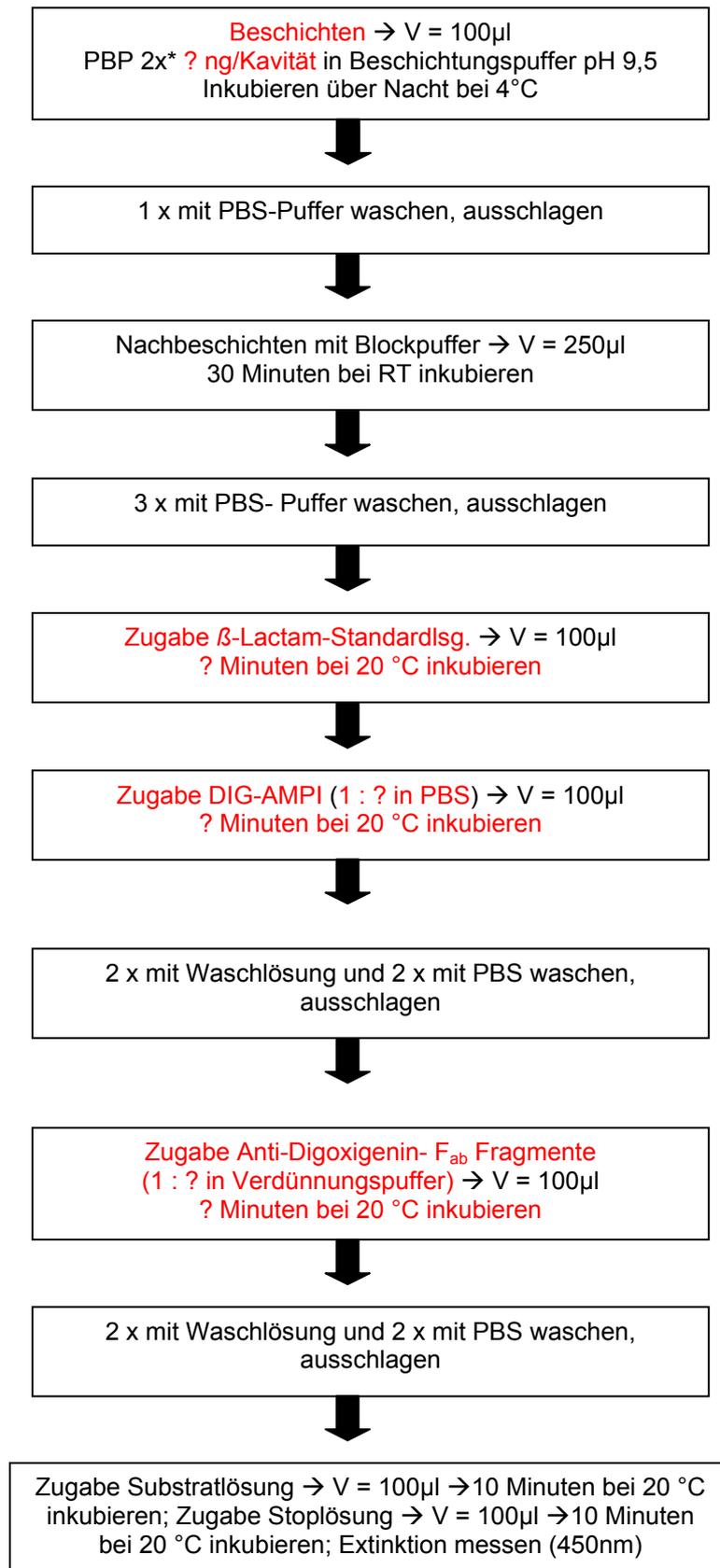


Abbildung 28: Arbeitsvorschrift für das Screening. Rot hervorgehoben sind die ausgewählten Einflussparameter. Das Fragezeichen markiert die zu optimierende Konzentration / Inkubationszeit

Die konsekutive Inkubation der Standards und des DIG-AMPI wurde ebenfalls aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten des PBP 2x* zu den verschiedenen Penicillinen und Cephalosporinen gewählt [74,75].

Die Reagenzien, die angesetzt wurden waren für die Durchführung aller Versuche in ausreichender Menge vorhanden, damit keine Verfälschung des Ergebnisses aus unterschiedlichen Reagenzienchargen auftritt. Außerdem wurden alle Reagenzien im Kühlschrank gelagert, um Einflüsse durch Lagerung zu vermeiden. Die Durchführung aller Versuche erfolgte innerhalb von 2 Tagen.

6.3.1.2 Design-Planung

Im Screening-Design sollten sechs Parameter überprüft werden. Die Einflüsse der Konzentrationen von PBP 2x*, Digoxigenin-markiertem Ampicillin und anti-Dig-F_{ab}-Fragmente sowie der Einfluss der Inkubationszeiten von Probe/Standardlösung mit β -Lactamen, DIG-AMPI und anti-Dig-F_{ab} Fragmenten. Für diese Parameter wurde ausgehend von den Vorversuchen bei der Testentwicklung folgender experimentelle Rahmen festgelegt.

| | Parameter | Screening-Design |
|---|---|------------------------|
| A | Konzentration PBP 2x* | 100 – 500 ng/Kavität |
| B | Konzentration (Verdünnungsfaktor) DIG-AMPI | 1: 10.000 – 1: 100.000 |
| C | Konzentration (Verdünnungsfaktor) F _{ab} Fragmente | 1: 1.000 – 1: 3.000 |
| D | Inkubationszeit β -Lactame | 15 min. – 60 min. |
| E | Inkubationszeit DIG-AMPI | 15 min. – 60 min. |
| F | Inkubationszeit F _{ab} Fragmente | 30 min. – 60 min. |

Tabelle 6: Experimenteller Rahmen des Screening-Designs

Die resultierende Extinktion wurde als Responsegröße herangezogen. Als Design wurde ein Fractional-Factorial-Design ausgewählt, da dieses weniger Experimente erfordert (16 statt 64). Die Auflösung war IV, so dass alle Haupteffekte mit den Wechselwirkungen von drei Parametern und alle Zweifach-Wechselwirkungen in Dreiergruppen vermengt sind (siehe auch Abbildung 12). Jedes Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Dreifachbestimmung am Zentralen Punkt.

Letztendlich ergab sich daraus ein Versuchsplan mit 51 Experimenten (siehe Anhang 1). Die Experimente wurden in randomisierter Reihenfolge bearbeitet.

6.3.1.3 Auswertung

Haupteffekte und Wechselwirkungen

In der Theorie wurde bereits beschrieben, wie die Ergebnisse eines Screening-Designs ausgewertet werden.

Als Balkengraphik sind hier nun die resultierenden Haupteffekte der eingesetzten Parameter dargestellt.

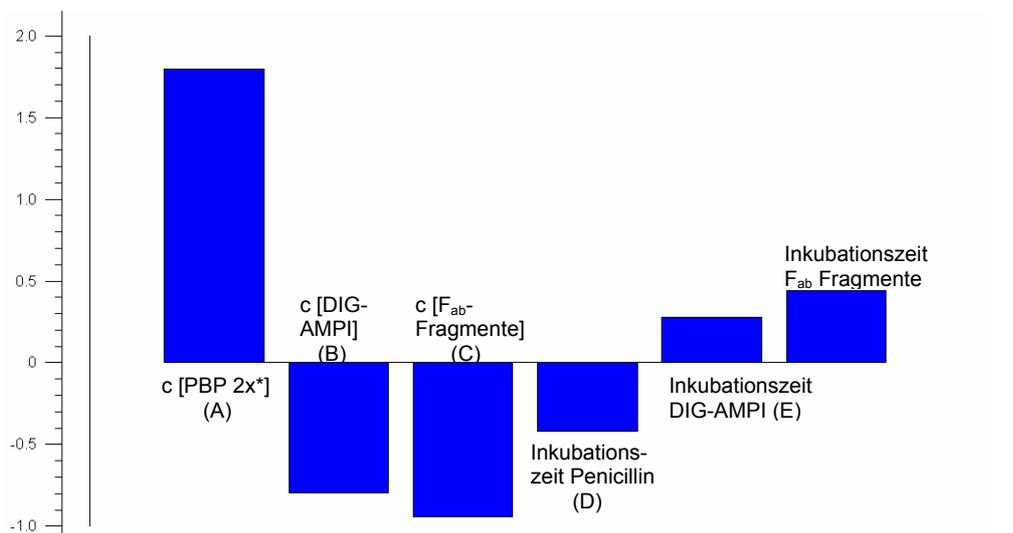


Abbildung 29: Balkengraphik des Screening-Designs (Haupteffekte). Positive y-Achse: zunehmende Extinktionswerte; negative y-Achse: abnehmende Extinktionswerte. Die Balkenhöhe repräsentiert die Stärke des Effekts. Nähere Erläuterung siehe Text.

Tabelle 7 zeigt zusätzlich die mittels Unscrambler[®] berechneten Effekte und p-Werte.

| Parameter | Effekt | p-Wert |
|---|---------|--------|
| Konzentration PBP 2x* | 1,796 | 0,0000 |
| Konzentration (Verdünnungsfaktor) DIG-AMPI | - 0,798 | 0,0000 |
| Konzentration (Verdünnungsfaktor) F _{ab} Fragmente | - 0,940 | 0,0000 |
| Inkubationszeit β-Lactame | - 0,419 | 0,0033 |
| Inkubationszeit DIG-AMPI | 0,277 | 0,0453 |
| Inkubationszeit F _{ab} Fragmente | 0,442 | 0,0020 |

Tabelle 7: Ermittelte Effekte und p-Werte

Aus der Tabelle und der Balkengraphik wird deutlich, dass die Beschichtungsmenge an PBP 2x* (A) den stärksten positiven Einfluss hat. Durch die Veränderung dieses Parameters wird somit die größte Veränderung der Extinktion bewirkt. Je größer nämlich die Menge an PBP 2x* auf der Mikrotiterplattenoberfläche ist, desto mehr PBP 2x*/DIG-AMPI-Komplexe können gebildet werden. Daraus resultiert, dass auch mehr F_{ab}-Fragmente an den Komplex binden, was eine verstärkte Farbentwicklung zur Folge hat. Dieselbe Erklärung hat auch Gültigkeit für die Inkubationszeiten von DIG-AMPI (E) und den anti-Digoxigenin-Fab Fragmenten (F). Je länger der Zeitraum ist, indem die Reaktionspartner miteinander wechselwirken können, desto größer ist auch die Möglichkeit eines sich bildenden Komplexes. Höhere Verdünnungsstufen von DIG-AMPI (B), aber auch der F_{ab}-Fragmente (C) zeigten einen negativen Effekt (Abnahme der Extinktion), da weniger Reaktionspartner im Testsystem anwesend sind. Eine Verlängerung der Inkubationszeit der β -Lactam-Standards (D) führt ebenfalls zu einer Extinktionsabnahme, da die Möglichkeiten der Bindung an das PBP 2x* erhöht sind und nun mehr β -Lactam-Bindestellen besetzt sind.

Bei der Interpretation der erhaltenen Haupteffekte muss beachtet werden, dass alle Haupteffekte mit den Dreifach-Wechselwirkungen vermengt sind. Da derartige Dreifach-Wechselwirkungen jedoch sehr selten auftreten und verglichen mit den Haupteffekten nur einen geringen Einfluss haben, wurden keine weiteren Experimente, um eine genauere Analyse der vermengten Effekte vorzunehmen, durchgeführt.

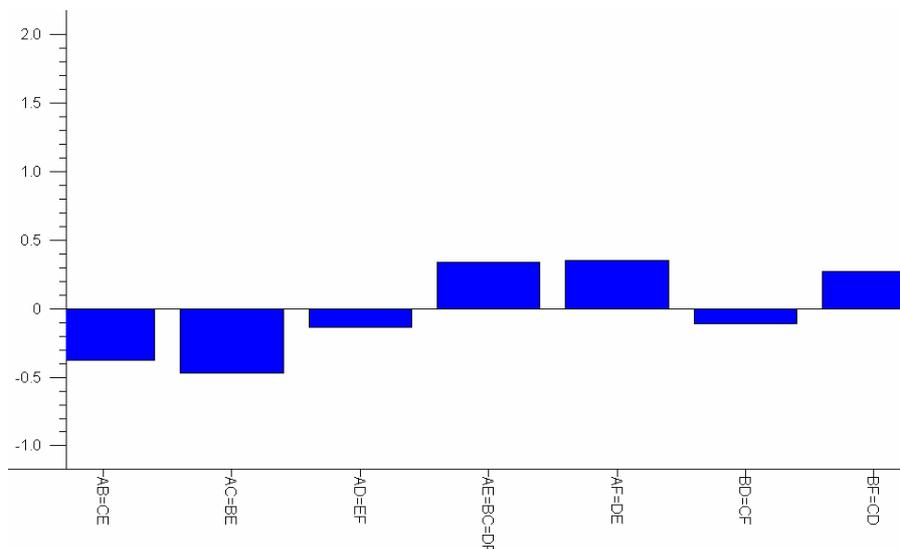


Abbildung 30: Balkengraphik des Screening-Designs (Wechselwirkungen). Nähere Erläuterungen siehe Text.

In Abbildung 30 sind nun die vermengten Wechselwirkungen des Screening-Designs als Balkengraphik dargestellt. Wie anhand der Graphik erkannt werden kann, sind zwei Zweifachwechselwirkungen sowie einmal drei Zweifachwechselwirkungen miteinander vermengt, so dass die beobachteten Effekte sehr gut erklärbar sind. So überwiegen bei der vermengten Wechselwirkung AB=CE die negativen Effekte der erhöhten Verdünnung von DIG-AMPI (B) und der Fab-Fragmente (C) gegenüber dem nur gering positiven Effekt der verlängerten Inkubationszeit von DIG-AMPI (E) und dem positiven Effekt der erhöhten PBP 2x*-Konzentration (A). Es resultiert ein negativer Gesamteffekt. So lassen sich auch mit Hilfe der Betrachtung der Haupteffekte auch die anderen Wechselwirkungseffekte erklären.

Der Normal-B-Plot kann wie bereits erläutert ebenfalls zur Ermittlung der signifikanten Parameter herangezogen werden. Hierbei wird die Größe der Effekte in Relation zu ihrer Wahrscheinlichkeit gesetzt. Für das durchgeführte Screening ergibt sich folgender Normal-B-Plot:

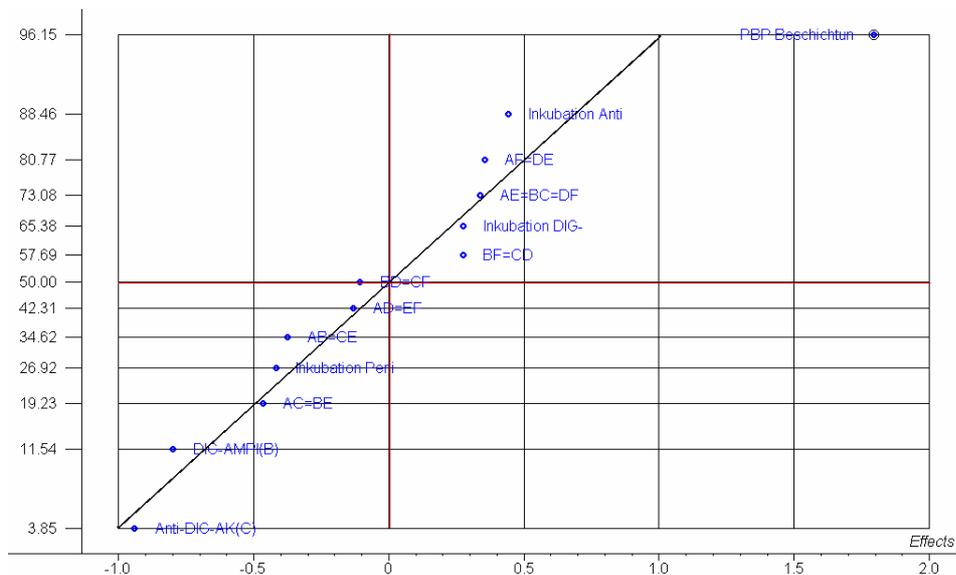


Abbildung 31: Normal-B-Plot der Effekte des Screening-Designs

Hierbei zeigt sich sehr deutlich, dass sich bis auf die PBP 2x*-Beschichtungsmenge keine deutlichen Abweichungen von der Normalverteilung zeigen.

Insgesamt kann gesagt werden, dass der Haupteffekt die PBP 2x*-Konzentration ist, da sowohl die Ermittlung über ANOVA als auch mittels des Normal-B-Plot dies ergeben hat. Die Optimierung dieses Parameters ist somit von größter Bedeutung.

Modellüberprüfung

Um die Verlässlichkeit der erstellten Modelle zu überprüfen, wurden diese auf ihre Signifikanz und Güte überprüft.

Vergleich der Standardabweichungen: Die Standardabweichungen über alle Experimente wurde mit der Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen am Zentralen Punkt verglichen. Je geringer dabei die Standardabweichung am Zentralen Punkt ist, desto schärfer ist das Modell und desto geringer ist der experimentelle Fehler.

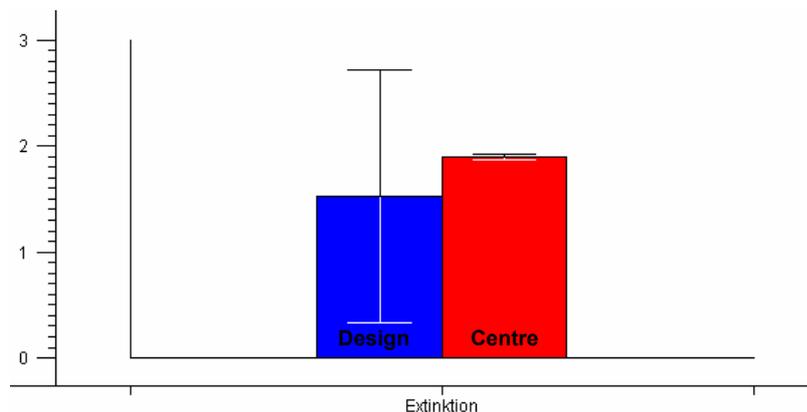


Abbildung 32: Standardabweichungen des Screening-Designs

Abbildung 32 zeigt deutlich, dass die Standardabweichung am Zentralen Punkt äußerst gering ist. Dies deutet auf ein sehr scharfes Design und einen kaum vorhandenen experimentellen Fehler hin.

Prüfung der Korrelation: Eine Überprüfung mittels der Korrelation der vorhergesagten und der gemessenen Werte wurde ebenfalls durchgeführt. Die graphische Darstellung (Abbildung 33) zeigt eine sehr gute lineare Korrelation. Der lineare Korrelationskoeffizient von 0,997 belegt dies ebenfalls.

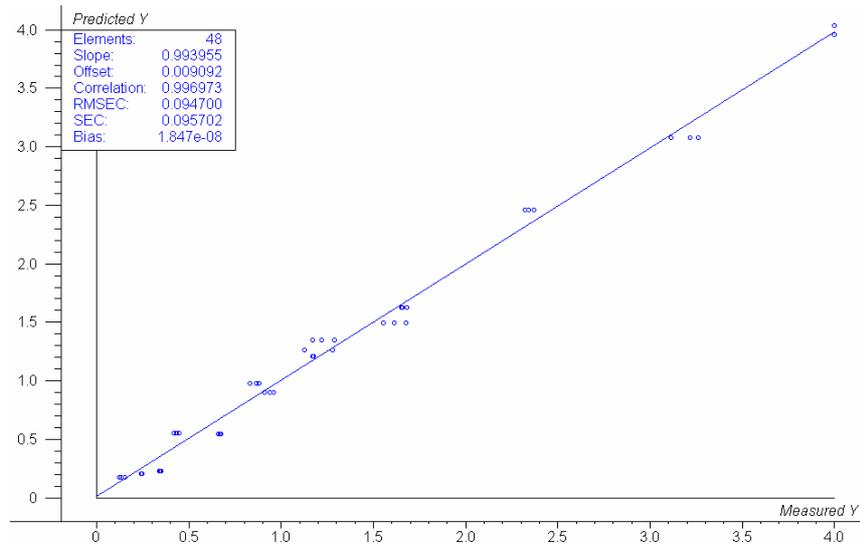


Abbildung 33: Korrelation der vorhergesagten gegen die gemessenen Werte (Predicted vs. Measured) des Screening-Designs

Kontrolle der Residuen: Die Kontrolle der Residuen erfolgte über die Erstellung eines 2D-Streudiagramms, indem die Responsewerte gegen die Residuen aufgetragen wurden. Die kleine Skalierung der y-Achse von Abbildung 34 zeigt schon, daß die verbleibenden Residuen sehr gering sind.

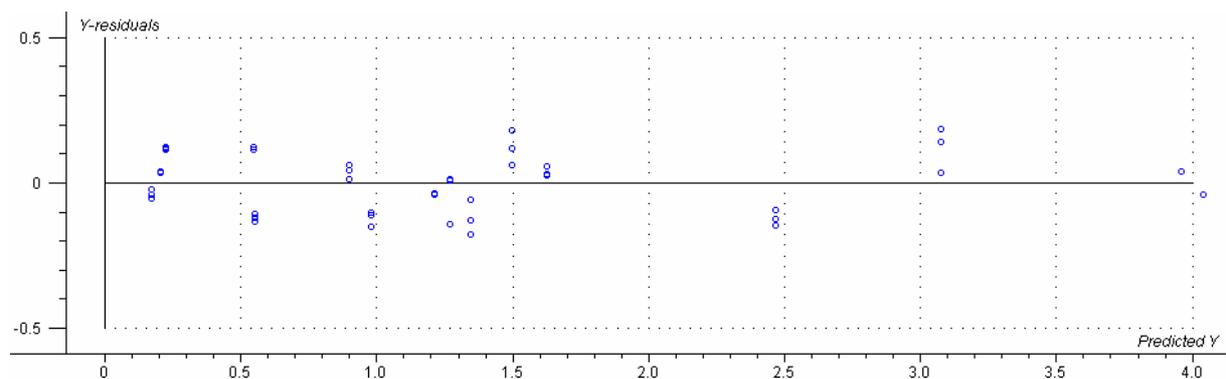


Abbildung 34: Kontrolle der Residuen des Screening-Designs

Eine abschließende Kontrolle erfolgt durch die Erstellung einer Liniengrafik der gemessenen und vorhergesagten Werte, die noch einmal die Wertestreuung anzeigt. Auch diese Graphik zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der gemessenen mit den vorhergesagten Werten.

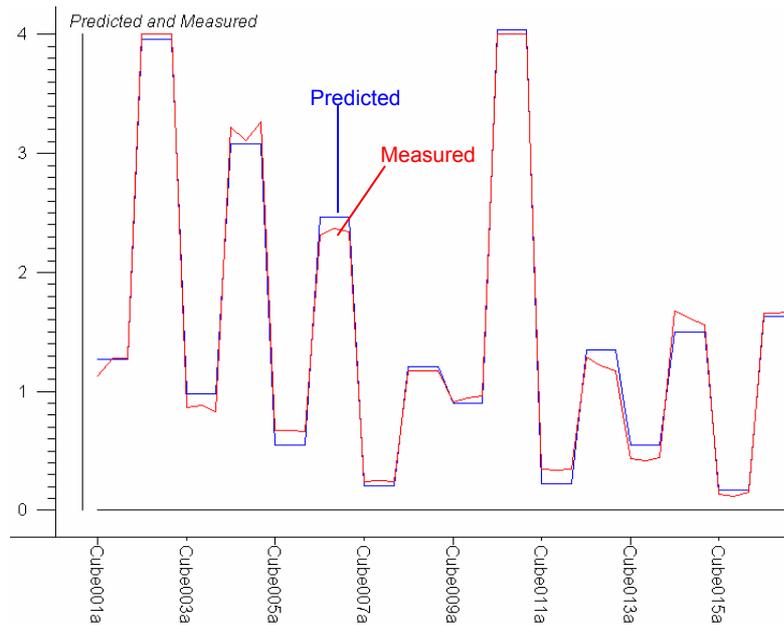


Abbildung 35: Liniengraphik der gemessenen und vorhergesagten Werte des Screening Designs

Insgesamt lässt sich anhand der Modellüberprüfungen aussagen, dass ein sehr scharfes Modell vorliegt. Die Modelle liefern vorhergesagte Werte die sehr gut mit den gemessenen korrelieren, so dass der gesamte experimentelle Raum gut modelliert ist und keine Ausreißer auftreten.

Der Einschluss eines Optimums wird mittels des Responsewertes am Zentralen Punkt überprüft. Abbildung 32 verdeutlicht, dass der mittlere Responsewert am Zentralen Punkt nur unwesentlich größer ist als der mittlere Responsewert über alle anderen Experimente. Dies lässt darauf schließen, dass kein Extremum im herkömmlichen Sinn eingeschlossen ist. Für eine genaue Betrachtung kann ein Oberflächenmodell herangezogen werden.

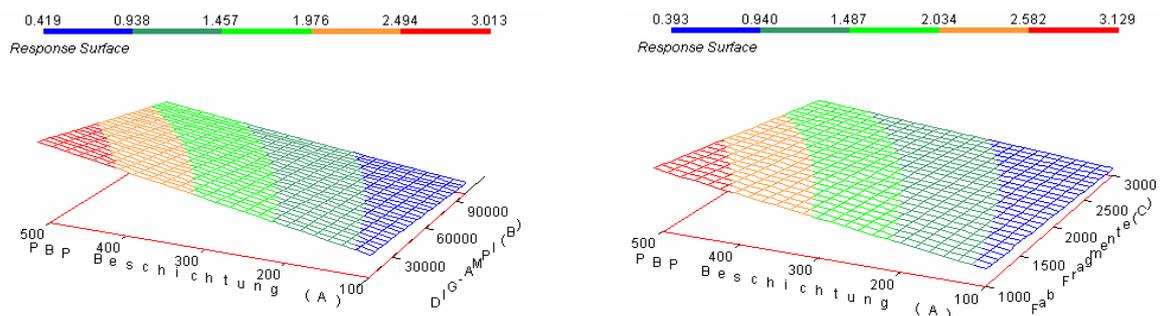


Abbildung 36: Oberflächenmodelle des Screening-Design. Die Inkubationszeiten wurden aufgrund ihres geringeren Einflusses auf die Werte am Zentralen Punkt festgelegt.

Die Überprüfung der Krümmung zeigt, dass ein linearer Zusammenhang besteht. Eine anschließende Optimierung kann eine optimale Verwendung der Reagenzien bewirken, so dass eine Extinktion resultiert, die noch in der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes liegt.

6.3.2 Optimierungs-Design

6.3.2.1 Experimentelles

Für das Optimierungs-Design wurden die gleichen Vorbereitungen wie für das Screening-Design getroffen. Die Temperatur wurde wieder bei 20 °C konstant gehalten.

6.3.2.2 Design-Planung

Die Ergebnisse des Screening-Designs wurden nun dafür verwendet, die Bedingungen für die Optimierung festzulegen. Da, wie in der Theorie bereits erwähnt, ein Design umso schärfer wird, desto weniger Parameter mit einbezogen werden, wurden nur die Parameter für die Optimierung ausgewählt, die den größten Effekt im Screening verursacht haben. Dies waren die Konzentrationen von PBP 2x*, DIG-AMPI und der anti-DIG-F_{ab} Fragmente. Die Inkubationszeiten wurden auf ihren mittleren Wert, der im Screening-Design durch das Statistikprogramm Unscrambler[®] für die Zentralen Punkte berechnet wurden, festgesetzt. Es konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht gesagt werden, in wie weit sich die Inkubationszeiten auf die Sensitivität des Testsystems auswirken. Je kürzer diese jedoch gewählt wurden, umso geringer war der erhaltene Response, so dass vermutet werden konnte, dass kürzere Inkubationszeiten die Testsensitivität herabsetzen. Ihr Einfluss war aber im Gegensatz zu dem Einfluss der Reagenzienkonzentrationen relativ gering.

Der Rahmen wurde deshalb nur für die anderen Parameter eingengt. Für die PBP 2x*-Konzentration wurde ein niedriger Bereich ausgewählt, um dieses aufwendig herzustellende Reagenz zu schonen. Außerdem konnte anhand der Oberflächenmodelle (Abbildung 36) erkannt werden, dass auch mit geringen Konzentrationen eine Extinktion um 1,0 erzielt werden kann.

Die Wahl der Optimierungsrahmen für die Parameter sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Optimierung wurde mittels eines Box-Behnken-Designs durchgeführt, da dieses Design weniger Experimente erfordert.

| | Parameter | Screening Design – Fractional Factorial | Optimierungs –Design Box-Behnken |
|----------|---|--|-------------------------------------|
| A | Beschichtungsmenge PBP 2x* | 100 – 500 ng/Kavität | 100 – 200 ng/Kavität |
| B | Verdünnungsfaktor DIG-AMPI | 1:10.000 – 1:100.000 | 1:40.000 – 1:60.000 |
| C | Verdünnungsfaktor anti-DIG F _{ab} Fragmente | 1:1.000 – 1:3.000 | 1:1.000-1:2.000 |
| D | Inkubationszeit: β -Lactam Standards | 15 – 60 Minuten | 37,5 Minuten |
| E | Inkubationszeit : DIG-AMPI | 15 – 60 Minuten | 37,5 Minuten |
| F | Inkubationszeit : F _{ab} Fragmente | 30 – 60 Minuten | 45 Minuten |

Tabelle 8: Parameter der chemometrischen Optimierung

Insgesamt wurde wieder eine Dreifachbestimmung durchgeführt sowie sechs Bestimmungen am Zentralen Punkt. Daraus resultierten 42 Experimente. Der Versuchsplan findet sich in Anhang 2. Die Experimente wurden wieder randomisiert durchgeführt.

6.3.2.3 Auswertung

Es wurden aus den erhaltenen Ergebnissen zwei Oberflächenmodelle mittels quadratischer Regression und Varianzanalyse berechnet.

Ermittlung der optimalen Bedingungen

Die optimalen Bedingungen wurden graphisch ermittelt, da es mit der verwendeten Software nicht möglich war, diese mathematisch zu ermitteln.

Alle p-Werte wiesen den Wert 0,0000 auf, das die Ergebnisse des Screening-Designs noch einmal bestätigte. Es wurden mehrere Oberflächenmodelle berechnet und graphisch ausgewertet. 2 Oberflächenmodelle, die zur Bestimmung der PBP 2x*-Menge verwendet wurden, sind in der Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt. Für die Beschichtungsmenge von PBP 2x* wurde der kleinstmögliche Wert (150 ng/Kavität) ausgewählt und beim Oberflächenmodell, das in Abbildung 39

dargestellt ist und zur Bestimmung der optimalen Verdünnungen von DIG-AMPI und der anti-DIG-F_{ab} Fragmente verwendet wurde, konstant gehalten.

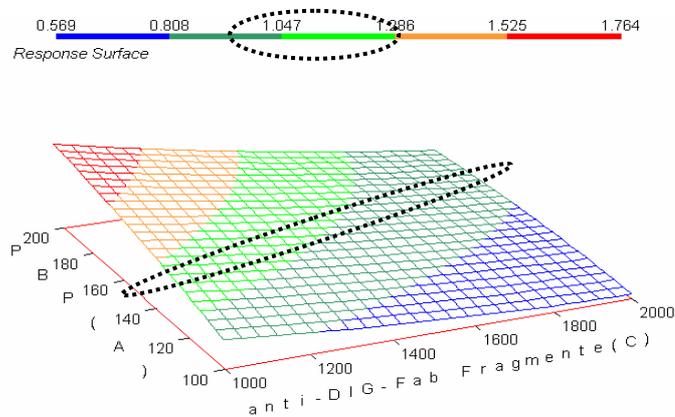


Abbildung 37: Oberflächenmodell des Optimierungs-Designs zur Bestimmung der PBP 2x*-Beschichtungsmenge (DIG-AMPI = 1:40.000). Es wurde die PBP 2x*-Menge gegen die Verdünnungen der anti-DIG-F_{ab} Fragmente aufgetragen. Die Ellipse markiert den Bereich der PBP 2x*-Beschichtungsmenge von 150 ng/Kavität.

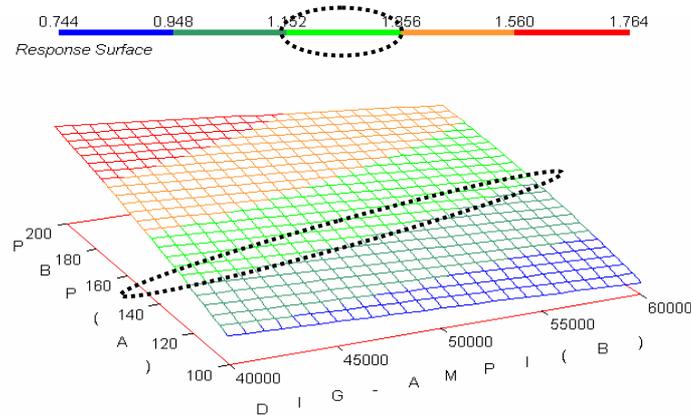


Abbildung 38: Oberflächenmodell des Optimierungs-Designs zur Bestimmung der PBP 2x*-Beschichtungsmenge (anti-DIG-F_{ab} Fragmente = 1:1.000). Es wurde die PBP 2x*-Menge gegen die Verdünnungen von DIG-AMPI aufgetragen. Die Ellipse markiert den Bereich der PBP 2x*-Beschichtungsmenge von 150 ng/Kavität.

Wie anhand der beiden Oberflächenmodelle zu erkennen ist, ist es bei einer Beschichtungsmenge von 150 ng/Kavität immer noch möglich in einem Extinktionsbereich von 1,0 – 1,3, wo die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes noch gewährleistet ist, zu messen.

Bei einer PBP 2x*-Beschichtungsmenge von 150 ng/Kavität ergab sich folgendes Oberflächenmodell:

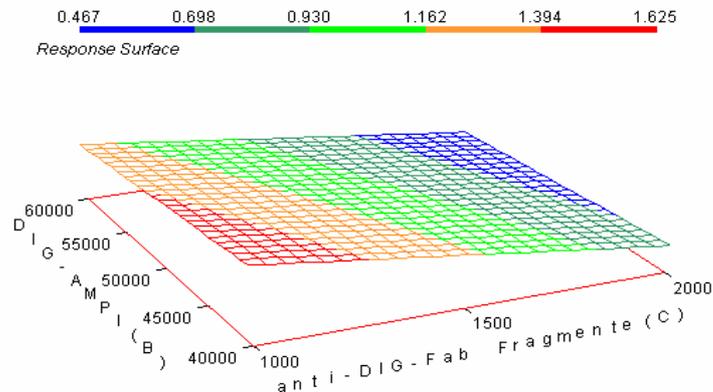


Abbildung 39: Oberflächenmodell des Optimierungs-Designs (PBP 2x* = 150 ng/Kavität)

Als optimierter Bereich wird ein Bereich zwischen 0,9 und 1,4 Extinktionseinheiten ermittelt, so dass die Extinktionen im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes liegen. Daraus können graphisch (Abbildung 40) noch folgende Optima ermittelt werden:

DIG-AMPI: 1:60.000

anti-DIG-F_{ab} Fragmente: 1:1.500

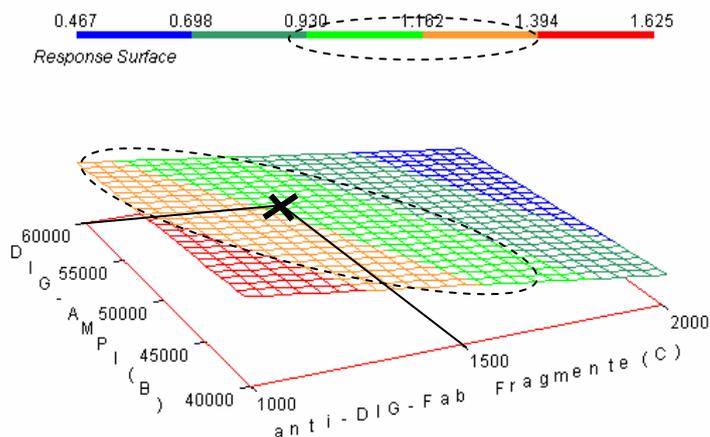


Abbildung 40: Graphische Auswertung des Oberflächenmodells

Es wurde ein Punkt ausgewählt, wo eine große Testrobustheit zu erwarten ist, da Abweichungen, wie zum Beispiel durch Pipettierfehler sich zwar auf die Extinktion auswirken, jedoch die Messwerte immer noch im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beer'schen Gesetz' liegen.

Modellüberprüfung

Die Modellüberprüfung erfolgt auf dem gleichen Wege wie beim Screening-Design. Als erstes wurden auch hier die Standardabweichungen miteinander verglichen.

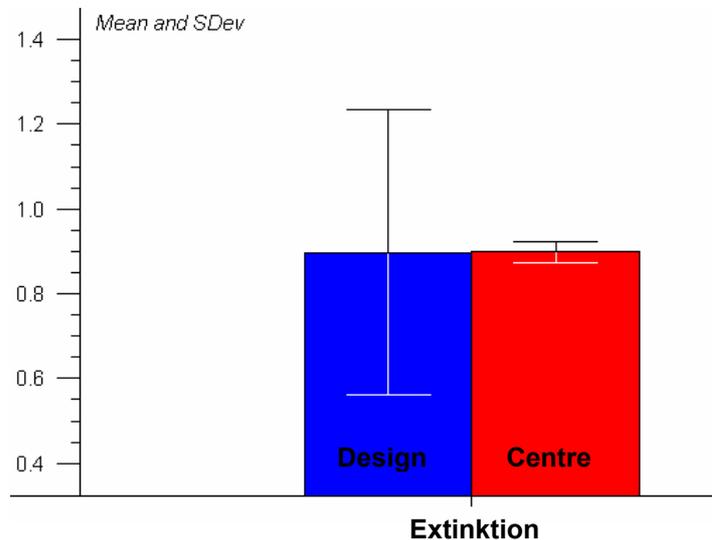


Abbildung 41: Standardabweichungen des Optimierungs-Designs

Die geringe Abweichung am Zentralen Punkt in Abbildung 41 zeigt, dass das Modell ausreichend scharf ist.

Der Korrelationskoeffizient von 0,959 aus der Auftragung des vorhergesagten gegen den gemessenen Wertes zeigt eine sehr gute Korrelation und damit ein signifikantes Modell.

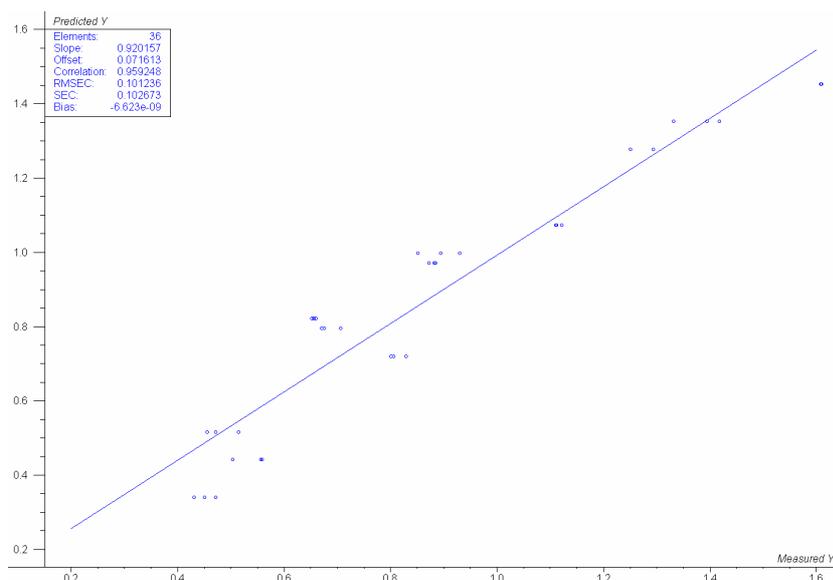


Abbildung 42: Korrelation der vorhergesagten gegen die gemessenen Werte (Predicted vs. Measured) des Optimierungs-Designs

Zur Kontrolle der Residuen wurde erneut ein 2D-Streudiagramm der Residuen erstellt.

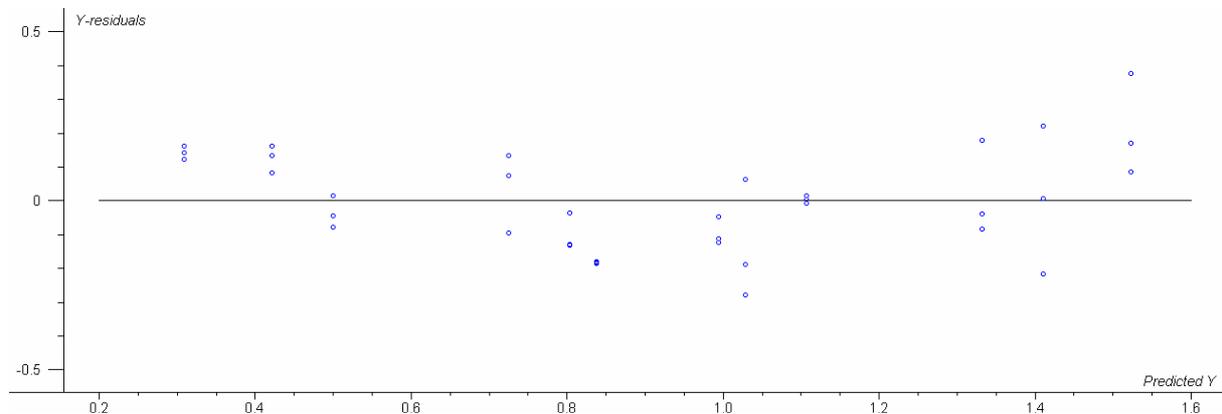


Abbildung 43: Kontrolle der Residuen des Optimierungs-Designs

Wie auch in Abbildung 43 zu erkennen ist, ist hier keine Clusterbildung erkennbar, so dass auch hier die Schärfe und Signifikanz des erstellten Modells deutlich wird.

6.3.3 Ergebnisvergleich Schachbretttitration vs. Experimental Design

Die Optimierung des Testsystems (bezüglich der Arbeitsbedingungen, die einen niedrigen Verbrauch des aufwendig hergestellten Reagenz PBP 2x* bei gleichzeitig hoher Extinktion (0,9-1,4)) mittels Experimental Design ergab eine PBP 2x*-Beschichtungsmenge von 150 ng/Kavität, eine DIG-AMPI-Verdünnung von 1:60.000 und für die Verdünnung der anti-DIG-F_{ab} Fragmente einen Wert von 1:1.500.

Mittels Schachbretttitration wurde dagegen eine PBP-Beschichtungsmenge von 300 ng/Kavität, eine DIG-AMPI-Verdünnung von 1:40.000 und eine Verdünnung von 1:1.000 der anti-DIG-F_{ab}-Fragmente ermittelt. Der direkte Vergleich zeigt, dass eine Optimierung mittels Experimental Design bessere Ergebnisse bezüglich der Einsparnis aufwendig herzustellender Reagenzien liefert. Auch konnten signifikante Parameter innerhalb von 2 Tagen erkannt werden und mussten nicht Step-by-Step über mehrere Wochen ermittelt werden. Die Anwendung des Designs machte eine Visualisierung der Ergebnisse möglich, die es wiederum ermöglichte die Testrobustheit zu erkennen und zudem eine Variation einzelner Parameter mit gleichzeitiger Kenntnis der Auswirkung der Änderung auf den Response (Extinktion) erlaubt.

6.4 Untersuchungen mit β -Lactam-Standardsubstanzen

Zur Untersuchung der β -Lactam-Standardsubstanzen und zur Ermittlung des 50 %-Wertes und der Nachweisgrenze wurde mit diesen jeweils eine Kalibrierkurve in PBS Puffer und in entfetteter Rohmilch erstellt. Zudem wurden mindestens 6 Puffer- bzw. Milchblanks zur Ermittlung des B_0 -Wertes aufgenommen und die Standardabweichung bestimmt. Die relativen Extinktionen ergaben sich aus $B/B_0 \times 100$. Die Konzentration, die bei einer relativen Extinktion von 50 % ermittelt werden konnte, diente dann zur Bestimmung der relativen Bindungsaffinität von PBP 2x* zu dem jeweiligen β -Lactam. Die Standardabweichung und der sich aus den B_0 -Werten ergebende Mittelwert wurden zur Ermittlung der Nachweisgrenze herangezogen. Die Nachweisgrenze, die die kleinste Konzentration, die sich mit ausreichender statistischer Sicherheit qualitativ noch erfassen lässt, darstellt, wurde aus der dreifachen Standardabweichung einer analytfreien Probe ermittelt. Die Nachweisgrenze wurde dabei für jedes β -Lactam individuell bestimmt, da vor allem die unterschiedliche Affinität des PBP 2x* gegenüber den jeweiligen Penicillinen und Cephalosporinen einen Einfluss auf die Nachweisgrenze ausübt. Eine Beispielberechnung zur Ermittlung der Nachweisgrenze findet sich in Kapitel 6.6.5.

6.4.1 Penicilline

Es wurden die Antibiotika Ampicillin, Benzylpenicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin, Nafcillin und Penicillin V untersucht. Im nachfolgenden sind die untersuchten Penicilline und die dazugehörigen Standardkalibrierkurven in PBS Puffer und entfetteter Rohmilch dargestellt. Die erwähnten MRL-Werte beziehen sich aus diesem Grund auf die für die Matrix Milch festgelegten Werte. Die roten Hilfslinien zeigen den MRL-Wert, die grünen Hilfslinien die ermittelte Nachweisgrenze für die Matrix Rohmilch und die blauen Hilfslinien wurden zur Ermittlung des 50 %-Wertes benötigt.

Die Kalibrierung mit Ampicillin erstreckte sich über einen Bereich von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Der 50 %-Wert konnte für Rohmilch zu 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt werden, die Nachweisgrenze zu 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

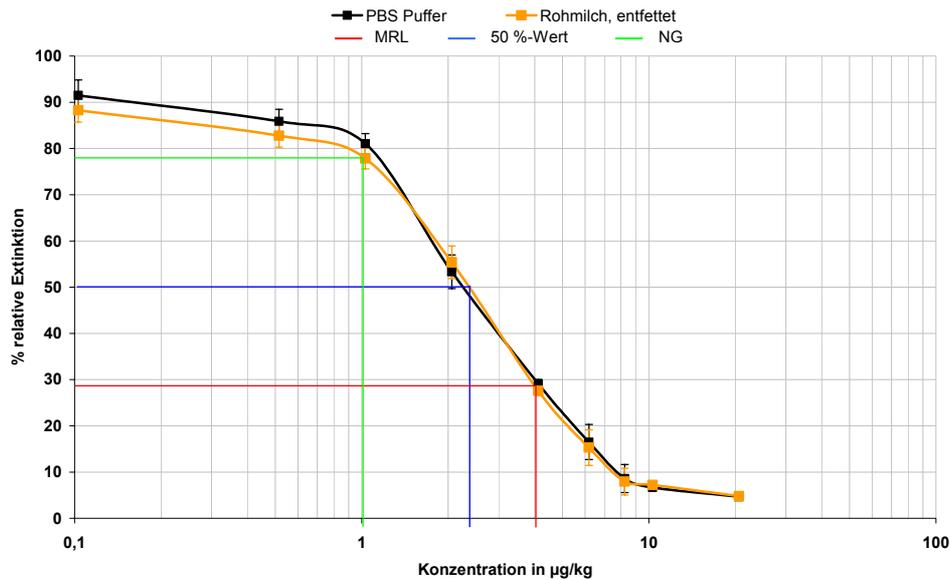


Abbildung 44: Kalibrierkurve Ampicillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Benzylpenicillin wurde wie Ampicillin im Konzentrationsbereich 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ untersucht. Die Kalibrierkurve ist in Abbildung 45 dargestellt. Es wurde ein 50 %-Wert von 1,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ermittelt und eine Nachweisgrenze von 0,85 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

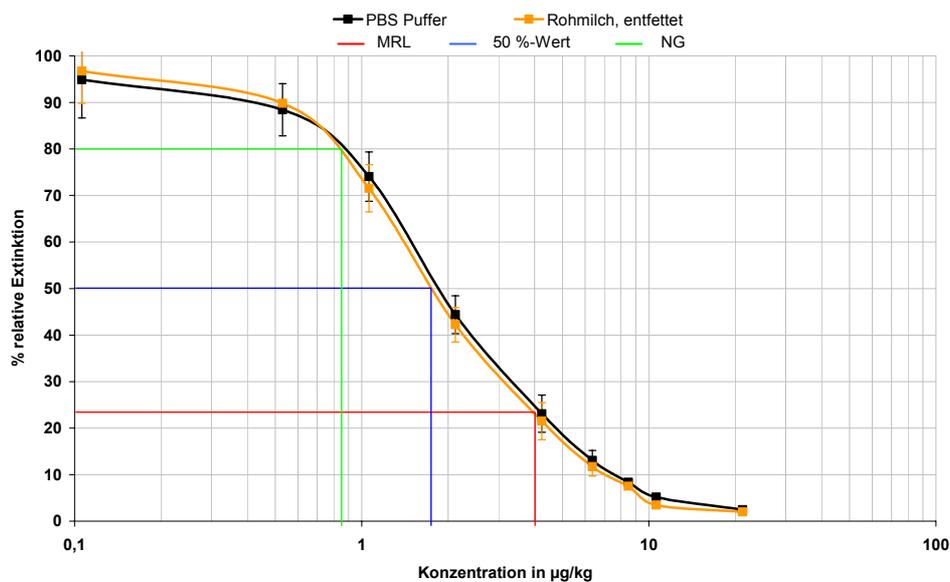


Abbildung 45: Kalibrierkurve Benzylpenicillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Amoxicillin zeigte, wie schon aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Benzylpenicillin und Ampicillin vermutet, einen ähnlichen Verlauf der Kalibrierung wie die beiden genannten Penicilline. Der 50 %-Wert wurde zu 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, die Nachweisgrenze zu 0,85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt.

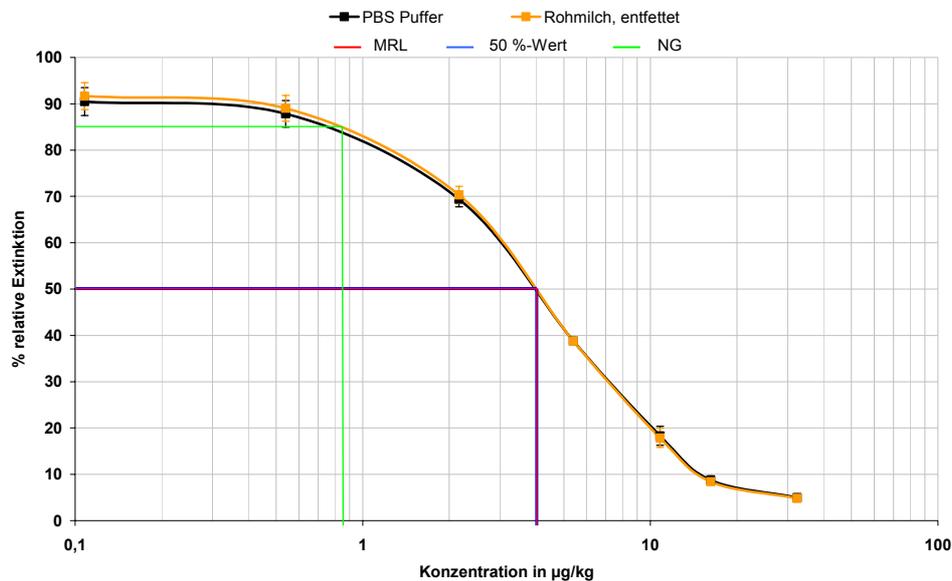


Abbildung 46: Kalibrierkurve Amoxicillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Cloxacillin, eines der in der EU zugelassenen drei Isoxazolylpenicilline konnte bis zu einer Konzentration von 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen werden. Der 50 %-Wert wurde zu 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt. Die Kalibrierung erstreckte sich dabei über einen Konzentrationsbereich von 10 – 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cloxacillin ist eines der Penicilline, das sehr häufig in Feldproben positiv nachgewiesen wird [162]. Testsysteme, wie der Charm ROSA [187] oder der von Gustavsson entwickelte Biosensor-Assay [140] sind jedoch nicht in der Lage Cloxacillin an seinem MRL für Milch nachzuweisen wie es mit dem entwickelten Rezeptortest möglich ist.

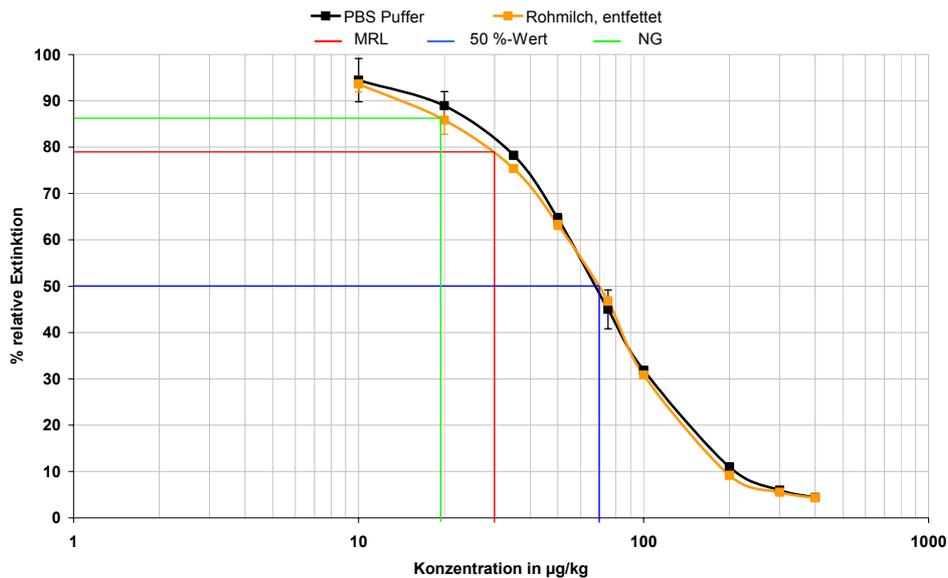


Abbildung 47: Kalibrierkurve Cloxacillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Für Dicloxacillin wurde eine Kalibrierung im Bereich von 0,5 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ angesetzt. Mit den durchgeführten Analysen wurde der 50 %-Wert für Dicloxacillin zu 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und die Nachweisgrenze zu 8,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ermittelt. Wie schon Ampicillin, Benzylpenicillin, Amoxicillin und Cloxacillin konnte auch Dicloxacillin an seinem MRL-Wert bestimmt werden.

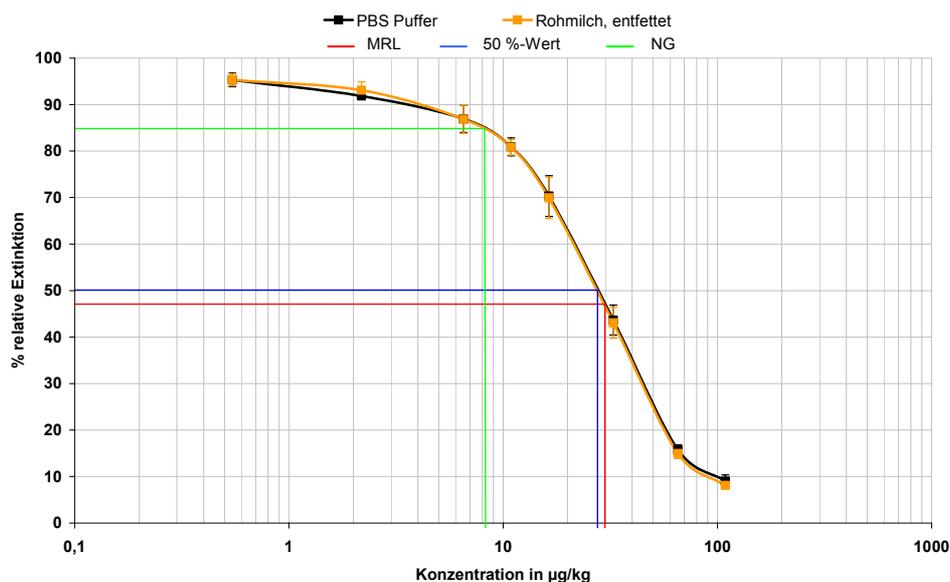


Abbildung 48: Kalibrierkurve Dicloxacillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Oxacillin zeigte von den drei Isoxazolylpenicillinen die höchste Affinität zum PBP 2x*. So lagen die Nachweisgrenze bei 4,0 µg/kg und der 50 %-Wert bei 13 µg/kg.

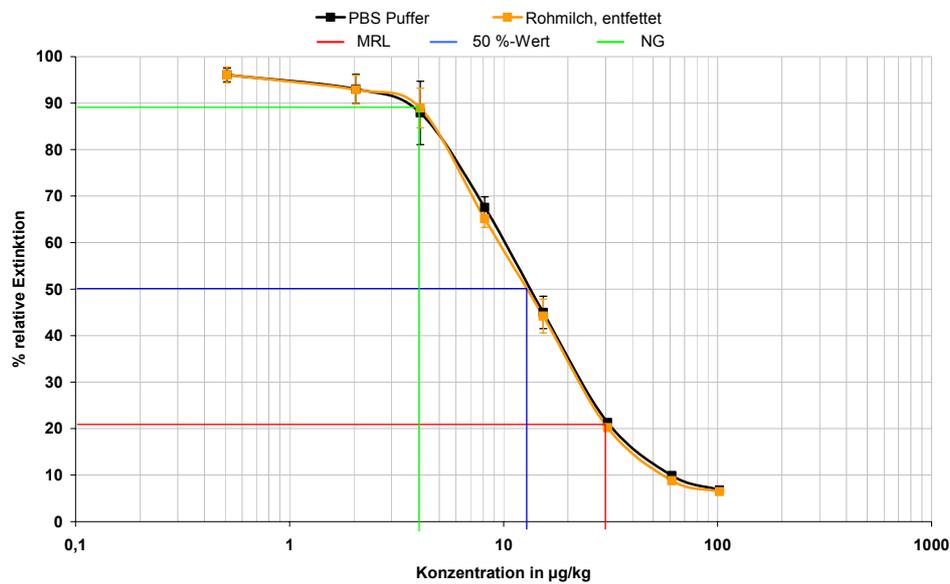


Abbildung 49: Kalibrierkurve Oxacillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Für Nafcillin konnte nach Kalibrierungen im Bereich zwischen 0,1 – 30 µg/kg eine Nachweisgrenze von 0,85 µg/kg und ein 50 %-Wert von 4,3 µg/kg ermittelt werden. Aufgrund der hohen Testsensitivität konnte Nafcillin noch in Konzentrationen, die mehr als das zehnfache unterhalb des MRL (30 µg/kg) lagen nachgewiesen werden.

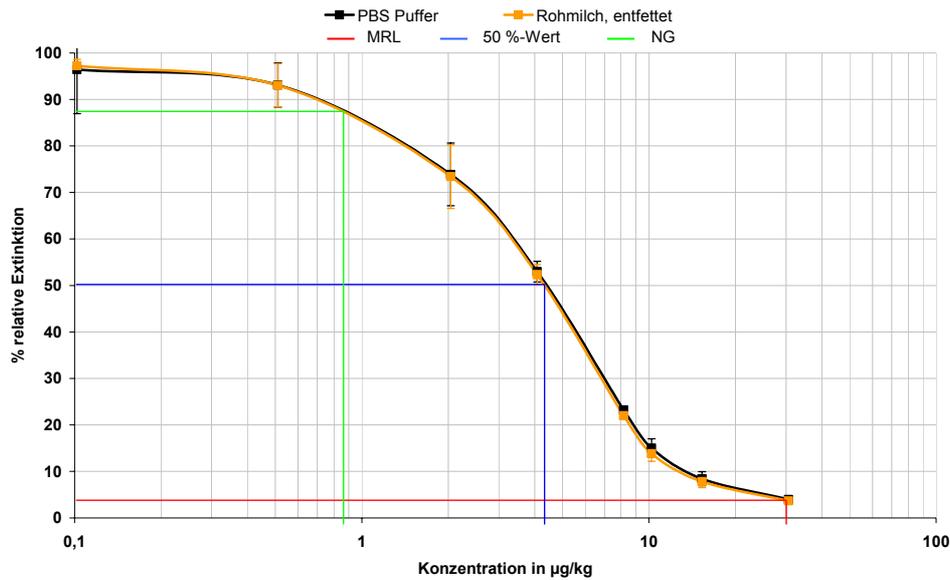


Abbildung 50: Kalibrierkurve Nafcillin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Das säureresistente und damit oral applizierbares Phenoxymethylpenicillin, konnte bis 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen werden. Der 50 %-Wert wurde zu 3,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt.

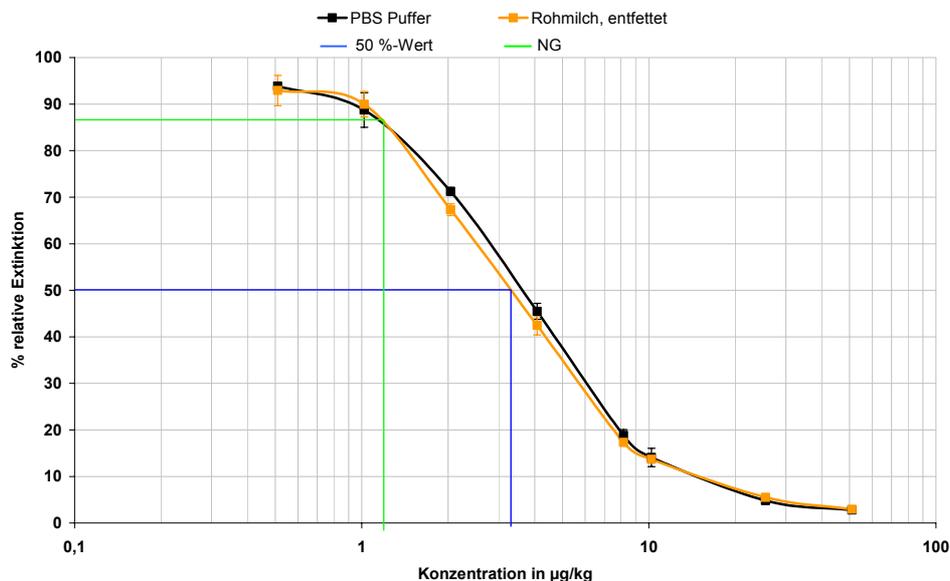


Abbildung 51: Kalibrierkurve Phenoxymethylpenicillin. Blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Alle Penicilline konnten an ihrem MRL nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle noch einmal zusammengefasst.

| Penicillin | MRL-Wert für Milch (µg/kg) | Nachweisgrenze (µg/kg) | 50 %-Wert |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Ampicillin | 4 | 1 | 2,4 |
| Benzylpenicillin | 4 | 0,85 | 1,7 |
| Amoxicillin | 4 | 0,85 | 4,0 |
| Cloxacillin | 30 | 19 | 70 |
| Dicloxacillin | 30 | 8,2 | 27 |
| Oxacillin | 30 | 4 | 13 |
| Nafcillin | 30 | 0,85 | 4,3 |
| Phenoxymethylpenicillin | - | 1,3 | 3,3 |

Tabelle 9: Vergleich der für Milch festgesetzten Höchstmengen (MRL) für die Penicilline mit den erzielten Nachweisgrenzen und 50 %-Werten

6.4.2 Cephalosporine

Es wurden Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom, Ceftiofur, Cefalexin Hydrat, Cefapirin, Desacetyl-Cefapirin, Cefazetril und Cefalonium untersucht. Im nachfolgenden sind die untersuchten Cephalosporine und die dazugehörigen Standardkalibrierkurven in PBS Puffer und entfetteter Rohmilch dargestellt. Es wurden wie bei den Penicillinen die Nachweisgrenzen und 50 %-Werte bestimmt.

Für Cefoperazon wurde eine Kalibrierkurve in einem Konzentrationsbereich von 5 – 400 µg/kg aufgenommen. Der 50 %-Wert wurde zu 82 µg/kg, die Nachweisgrenze zu 25 µg/kg für die Matrix Rohmilch bestimmt.

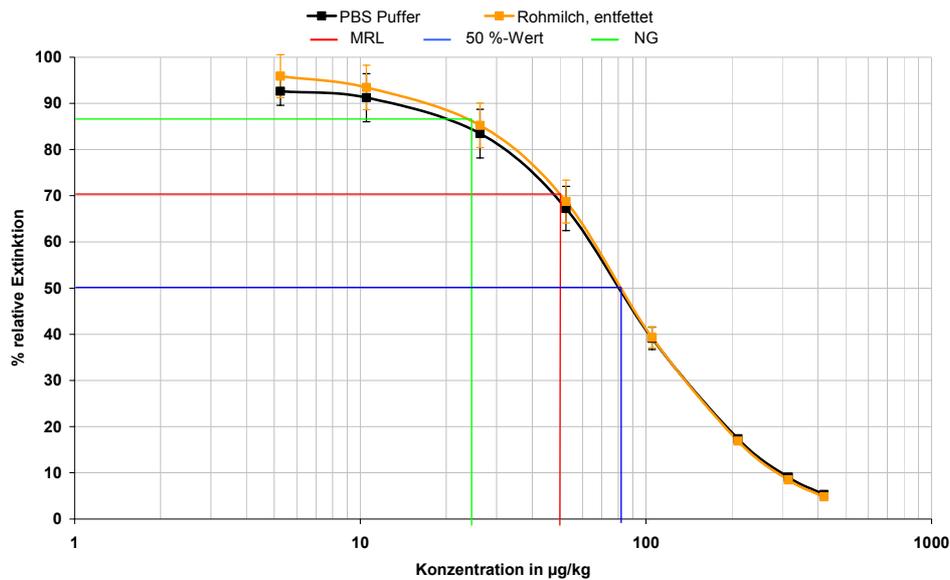


Abbildung 52: Kalibrierkurve Cefoperazon. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmengung), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Die Cefquinom-Kalibrierung erstreckte sich über einen Bereich von 0,5 – 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cefquinom konnte dabei bis zu einer Konzentration von 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen werden. Der 50 %-Wert wurde zu 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt. Für eine Quantifizierung am MRL müsste die zu untersuchende Probe verdünnt werden, da die hohe Sensitivität des Testsystems, wie anhand der Cefquinom-Kalibrierkurve zu erkennen ist, dieses bedingt.

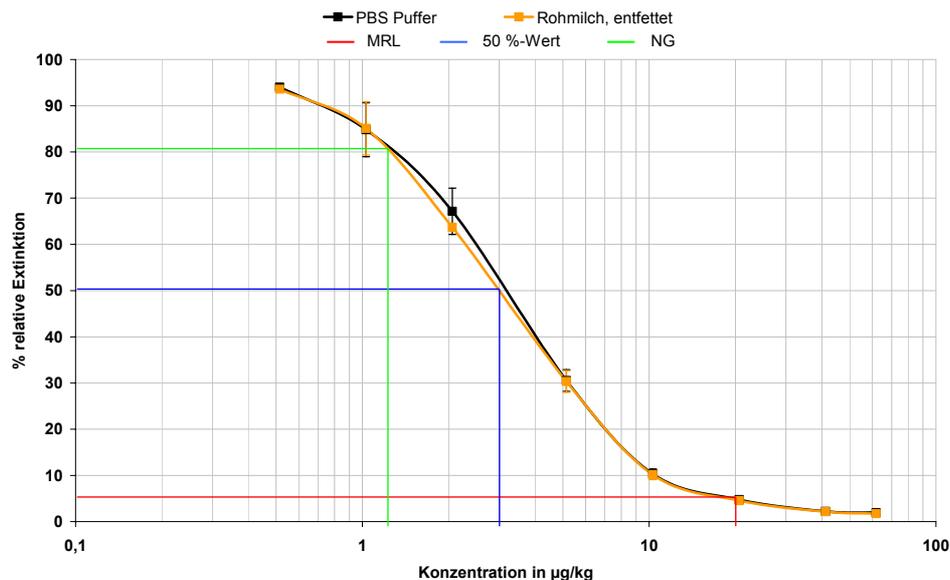


Abbildung 53: Kalibrierkurve Cefquinom. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmengung), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Für Cefapirin wurde eine Kalibrierung im Bereich von 0,5 – 400 µg/kg angesetzt. Mit den durchgeführten Analysen wurde der 50 %-Wert für Cefapirin zu 4,9 µg/kg und die Nachweisgrenze zu 1,6 µg/kg ermittelt.

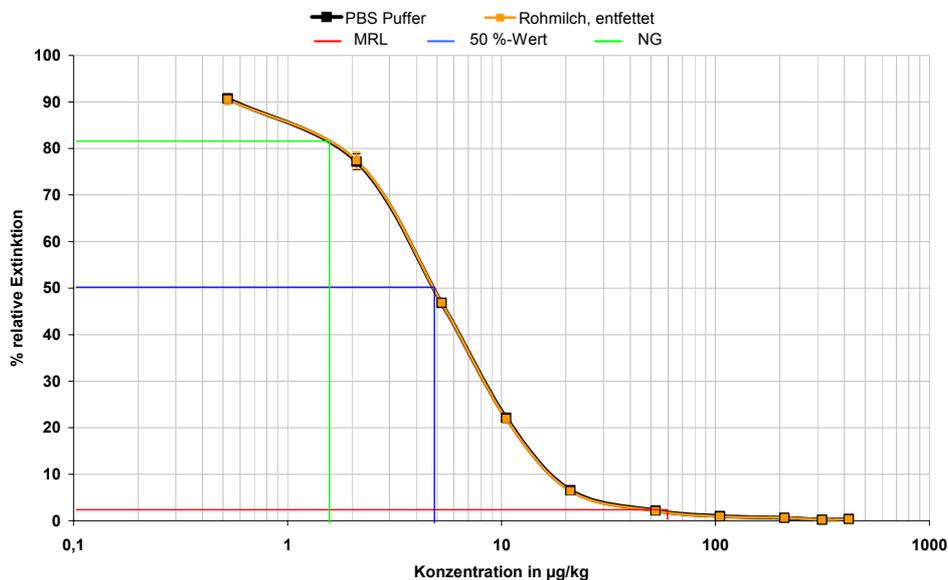


Abbildung 54: Kalibrierkurve Cefapirin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmengung), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Der MRL-Wert für Cefapirin setzt sich aus der Summe des Cefapirin-Gehaltes und seines noch biologisch aktiven Metabolites Desacetyl-Cefapirin zusammen. Aus diesem Grund wurde auch für Desacetyl-Cefapirin eine Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,5 – 400 µg/kg angesetzt. Es wurde eine Nachweisgrenze von 5,8 µg/kg und ein 50 %-Wert von 26 µg/kg ermittelt und zeigte eine geringere Affinität zum PBP 2x* im Vergleich zu der Muttersubstanz Cefapirin.

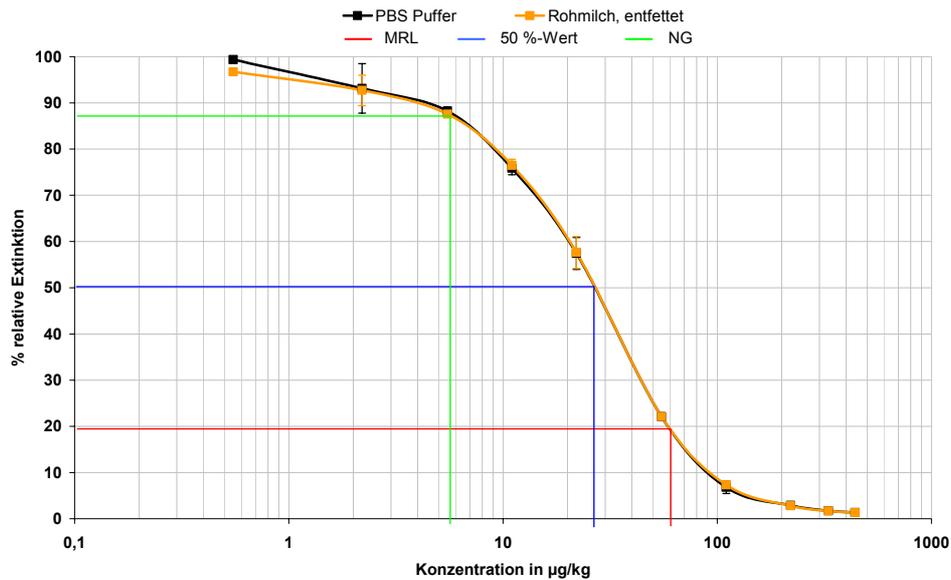


Abbildung 55: Kalibrierkurve Desacetyl-Cefapirin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmengung), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Cefacetril wies eine Nachweisgrenze von 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und einen 50 %-Wert von 72 $\mu\text{g}/\text{kg}$ auf, so dass eine Bestimmung am MRL direkt möglich war.

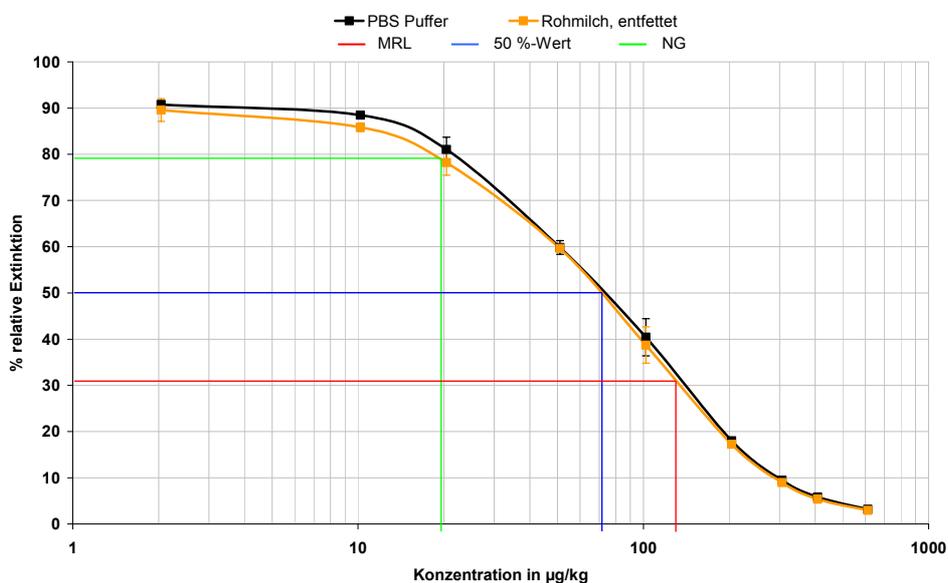


Abbildung 56: Kalibrierkurve Cefacetril. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmengung), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Für Cefazolin wurden eine Nachweisgrenze von 10,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und ein 50 %-Wert von 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt. Cefazolin konnte somit direkt am MRL bestimmt werden.

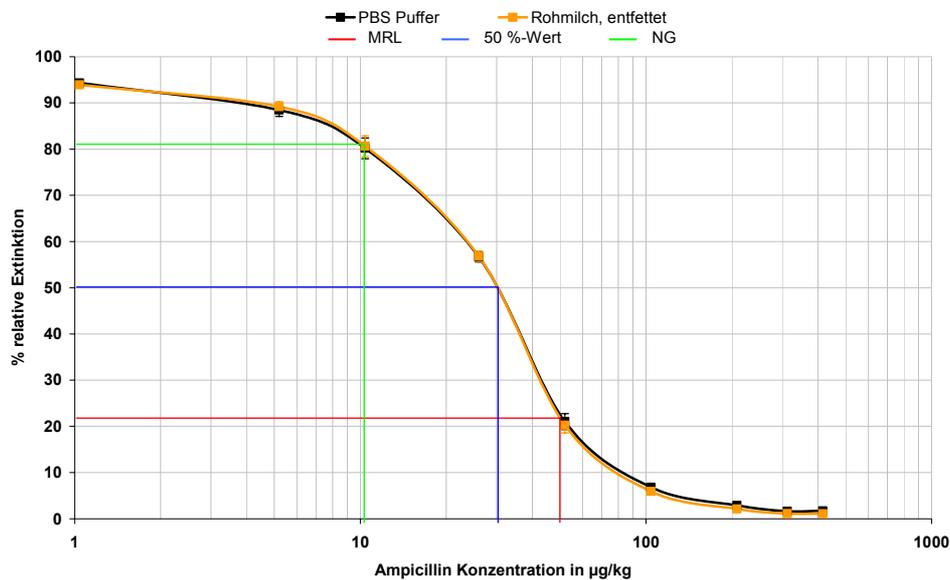


Abbildung 57: Kalibrierkurve Cefazolin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Nach den bereits publizierten k_2/K -Werten besitzt Cefalexin die geringste Affinität gegenüber dem PBP 2x* [74,75]. Die geringe Affinität konnte auch im Mikrotiterplattentest gezeigt werden. Erst bei hohen Konzentrationen war eine Extinktionsabnahme zu beobachten, was sich in dem 50 %-Wert von 340 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und der Nachweisgrenze von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ widerspiegelt.

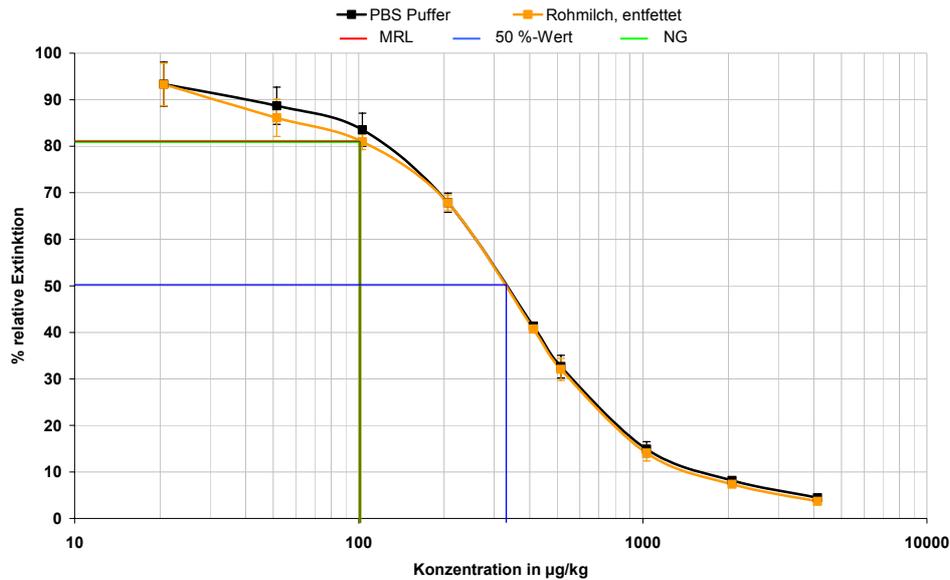


Abbildung 58: Kalibrierkurve Cefalexin. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Ein Nachweis am MRL für Milch findet direkt an der Nachweisgrenze statt. Eine Identifizierung positiver Proben war jedoch möglich. Der Test wurde als Screening-Test entwickelt mit der Option der Quantifizierung bei bekanntem β -Lactam. Durch Erniedrigung des PBP 2x*-Gehalts auf der Mikrotiterplatte konnte die Testsensitivität erhöht und somit eine Quantifizierung des Cefalexins ermöglicht werden. Eine Anpassung des Mikrotiterplattentests an das zu quantifizierende β -Lactam ist demnach möglich.

Für Ceftiofur wurden eine Nachweisgrenze von 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und ein 50 %-Wert von 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ermittelt. Ein Nachweis am MRL ist aufgrund der hohen Sensitivität somit nach Verdünnung der Probe möglich. Der MRL-Wert ist jedoch für die Summe aus der Muttersubstanz Ceftiofur und dem Metabolit Desfuroylceftiofur festgelegt. Da jedoch keine Möglichkeit bestand mittels LC-MS/MS die Synthese des Desfuroylceftiofurs zu verfolgen, wurde Desfuroylceftiofur nicht eigenständig wie bei [188] synthetisiert werden. Auch war diese Substanz nicht käuflich zu erwerben. Somit kann keine Aussage über die Bindungsaffinität des PBP 2x* zum Desfuroylceftiofur getroffen werden.

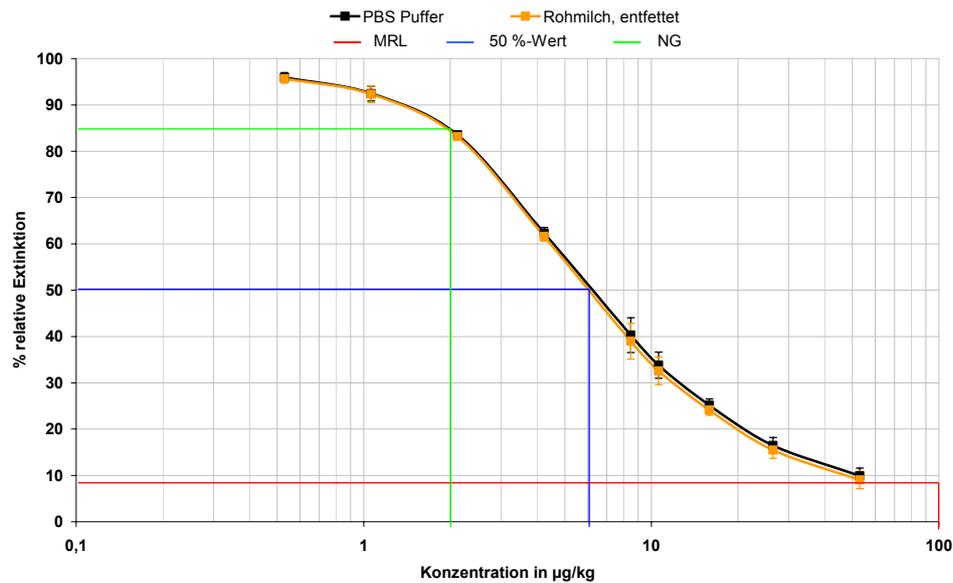


Abbildung 59: Kalibrierkurve Cefotiofur. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Cefalonium zeigte nach den Analysen eine noch geringere Affinität gegenüber dem PBP 2x* als Cefalexin. So wurde für die Nachweisgrenze ein Wert von 250 µg/kg und für den 50 %-Wert von 540 µg/kg ermittelt. Ein Nachweis am MRL von 20 µg/kg ist nicht möglich, so dass das Testsystem so nicht für den Nachweis von Cefalonium geeignet ist und das System bezüglich der Empfindlichkeit für dieses β -Lactam noch modifiziert werden müsste.

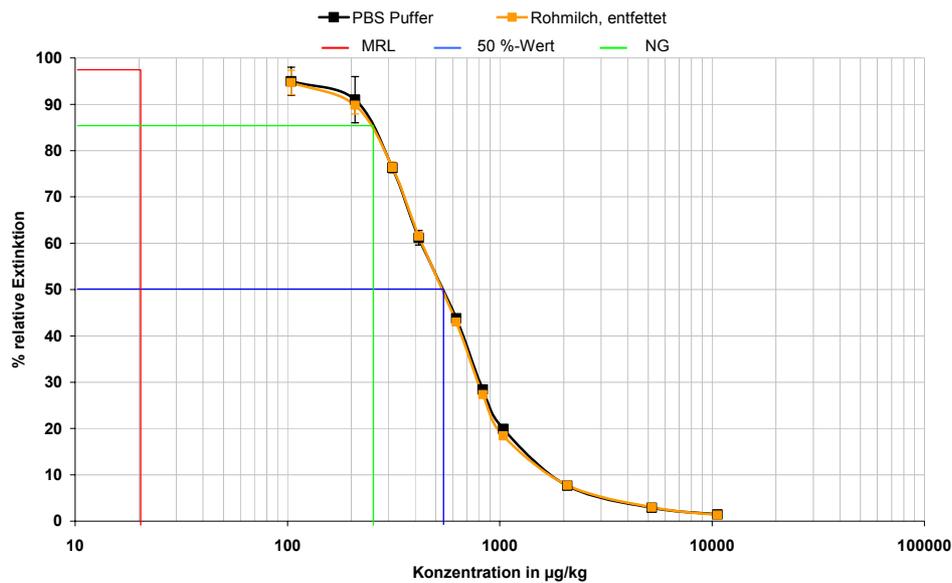


Abbildung 60: Kalibrierkurve Cefalonium. Rote Linien: MRL = Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge), blaue Linien: 50 %-Wert = dient zur Ermittlung der Bindungsaffinität des PBP 2x* zum jeweiligen β -Lactam, grüne Linien: NG = Nachweisgrenze. Die Linien wurden für die Matrix Rohmilch eingezeichnet.

Alle Cephalosporine bis auf Cefalonium konnten an ihrem MRL für Milch nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle noch einmal zusammengefasst.

| Cephalosporin | MRL-Wert für Milch ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Nachweisgrenze ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 50 %-Wert |
|--------------------|--|--|-----------|
| Cefacetil | 125 | 19 | 72 |
| Cefalexin | 100 | 100 | 340 |
| Cefalonium | 20 | 250 | 540 |
| Cefapirin | Summe: | 1,6 | 4,9 |
| Desacetylcefapirin | 60 | 5,5 | 26 |
| Cefazolin | 50 | 10,5 | 30 |
| Cefoperazon | 50 | 25 | 82 |
| Cefquinom | 20 | 1,2 | 3 |
| Ceftiofur | 100 | 2,0 | 6 |

Tabelle 10: Vergleich der für Milch festgesetzten Höchstmengen (MRL) für die Cephalosporine mit den erzielten Nachweisgrenzen und 50 %-Werten

6.4.3 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität

Zur Bestimmung der relativen Bindungsaffinität wurden Wettbewerbsversuche mit allen in der EU-relevanten Penicillinen und Cephalosporinen durchgeführt. Als Bezugswert (100%) wurde Ampicillin ausgewählt, da die Bindungsaffinität des PBP 2x* zu Ampicillin im Gegenteil zu den anderen β -Lactamen in einer vergleichbareren Größenordnung liegt wie die Bindungsaffinität des PBP 2x* zu DIG-AMPI, das als Wettbewerbspartner in dem entwickelten Mikrotiterplattentest diente. Ebenfalls wurden die durch alkalische Hydrolyse gewonnenen Penicilloinsäuren von Benzylpenicillin und Ampicillin in die Untersuchung mit einbezogen. Für jede Substanz wurden Standardkurven bei 20 °C aufgenommen und die 50%-Werte bestimmt (siehe 6.4.2). Die konstante Temperatur diente dazu, die Reaktionskinetik des PBP in Bezug auf die Temperatur konstant zu halten, so dass die Bindungsaffinität nur noch von dem entsprechenden β -Lactam abhängt und nicht zusätzlich von der Umgebungstemperatur beeinflusst wird, die an dem jeweiligen Tag der Analyse vorherrschte. Die Untersuchungen zu den Bindungsaffinitäten zeigten, dass das PBP 2x* keine Bindungsaffinität zu den geöffneten β -Lactam-Formen zeigt, jedoch bei allen MRL-relevanten β -Lactam-Antibiotika bis auf Cefalonium eine ausreichend hohe Bindungsaffinität aufweist, so dass eine Messung am kleinsten festgelegten MRL, dem der Milch, möglich war. Bei Cefalexin war eine Messung am MRL noch möglich, jedoch war eine Quantifizierung und eine Bestimmung am $\frac{1}{2}$ MRL nicht mehr möglich. Die ermittelten relativen Bindungsaffinitäten für die untersuchten β -Lactame sind in Tabelle 11 aufgeführt.

| β-Lactam Antibiotikum | % Bindungsaffinität bei 50 % B/B₀ | $\mu\text{g}/\text{kg}$ bei 50 % B/B₀ | MRL Milch | MRL Muskel- fleisch |
|---|---|--|----------------------|------------------------------------|
| Ampicillin | 100 | 2,4 | 4 | 50 |
| Amoxicillin | 60 | 4,0 | 4 | 50 |
| Benzylpenicillin | 141 | 1,7 | 4 | 50 |
| Cloxacillin | 3 | 70 | 30 | 300 |
| Dicloxacillin | 9 | 27 | 30 | 300 |
| Nafcillin | 56 | 4,3 | 30 | 300 |
| Oxacillin | 19 | 13 | 30 | 300 |
| Phenoxymethylpenicillin | 73 | 3,3 | -# | 25 |
| Cefacetil | 3 | 72 | 125 | -* |
| Cefalexin | 0,7 | 340 | 100 | 200 |
| Cefalonium | 0,4 | 540 | 20 | -* |
| Cefapirin | 49 | 4,9 | Summe: | Summe: |
| Desacetylcefapirin | 9 | 26 | 60 | 50 |
| Cefazolin | 8 | 30 | 50 | -** |
| Cefoperazon | 3 | 82 | 50 | -* |
| Cefquinom | 80 | 3,0 | 20 | 50 |
| Ceftiofur | 40 | 6,0 | 100 | 1000 |
| Penicilloinsäuren | 0 | | 0 | |

Tabelle 11: Vergleich der ermittelten relativen Bindungsaffinität und des 50 %-Wertes mit der für Milch und Muskelfleisch festgesetzten Höchstmenge (MRL). Die ermittelten Werte für die Kreuzreaktivität wurden gerundet. #nur für Schweine und Geflügel (nicht für Tiere, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind) zugelassen und in Anhang 1 der VO (EWG) Nr. 2377/90 aufgeführt * Diese Stoffe finden sich für Rinder im Anhang II der VO (EWG) Nr. 2377/90 ** wie * nur zusätzlich für Schafe und Ziegen

6.5 Matrixeinflüsse

Über die Bindungsaffinität hinaus ist das Verhalten des Mikrotiterplattentests gegenüber Matrixbestandteilen sehr bedeutsam für die Selektivität. Matrixbestandteile liegen, bezogen auf die meist in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden Analyten, immer im Überschuss vor, so dass es je nach Zusammensetzung und Konzentration der Matrixbestandteile zu einer Beeinträchtigung des Testsystems kommen kann. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Matrices und ihr Einfluss auf den entwickelten Mikrotiterplattentest untersucht.

Da β -Lactame hauptsächlich zur Behandlung von Mastitis eingesetzt werden und schon in geringen Konzentrationen das Wachstum von Starterkulturen, die in der Milchindustrie Verwendung finden, inhibieren, wurde als erste untersuchte Matrix Milch ausgewählt.

6.5.1 Milch

Zur Untersuchung des Matrixeinflusses von Milch wurden Studien für unterschiedliche Milcharten (Rohmilch, Vollmilch, fettarme Milch), unterschiedliche Behandlungen der Milchproben (Entfettung, Lyophilisierung) sowie mit verschiedenen Anteilen an Milch zu PBS-Puffer durchgeführt. Desweiteren wurde neben Kuhmilch auch käuflich erwerbbar Ziegenmilch untersucht. Es wurden Standardkurven in PBS und in PBS mit unterschiedlich hohen Milchanteilen erstellt. Dabei wurde für die β -Lactame beispielhaft Ampicillin zur Kalibrierung eingesetzt. Milch von Kühen unterschiedlicher Herkunft zeigte keinen veränderten Matrixeinfluss auf das Testsystem (Näheres siehe 6.6.1).

6.5.1.1 Rohmilch

Als erste Matrix wurde Rohmilch ausgewählt und der Einfluss der Milch auf den Mikrotiterplattentest untersucht. Dabei konnte der Rezeptortest direkt auf diese Zielmatrix übertragen werden. Um die Matrixeinflüsse zu quantifizieren, wurde eine

Standardkalibrierkurve in PBS-Puffer aufgenommen und mit einer Kalibrierkurve in Rohmilch verglichen. Die Extinktion war dabei umso geringer je stärker der Matrixeinfluss war. Mit zunehmender Verdünnung der Rohmilch näherte sich die Matrixkalibrierkurve der Standardkalibrierkurve in PBS-Puffer an. Bei einer 10 %igen Rohmilchlösung sind die Extinktionswerte, mit denen der PBS-Standardkurve vergleichbar. Der Effekt, dass die Extinktionswerte bei geringen Milchzusätzen über den Werten des verwendeten Puffers liegen wurde schon von Märtlbauer [182] beobachtet. Es wurde jedoch keine Erklärung für diesen Effekt gefunden. Bei dem entwickelten Mikrotiterplattenassay machte sich dieser Effekt jedoch nur minimal bemerkbar.

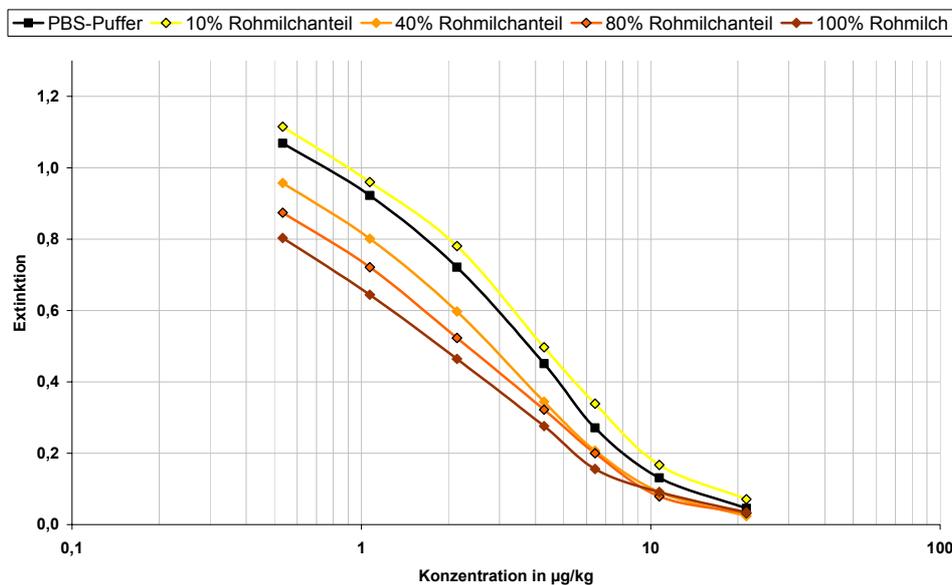


Abbildung 61: Matrixeffekt unterschiedlich mit PBS Puffer verdünnter Rohmilch

Wurde die Rohmilch durch Zentrifugation entfettet, wie in 9.5.5 beschrieben, war kein Matrixeffekt mehr feststellbar und die Extinktionswerte waren mit den Werten der PBS-Kalibrierung vergleichbar. Rohmilchproben wurden lyophilisiert und im Anschluß für eine Woche im Kühlschrank gelagert. Nach der Rekonstitution der Proben wurden diese entfettet und im Anschluß analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Lyophilisierung und Rekonstitution keinen negativen Effekt auf das Testsystem hatten (Abbildung 62).

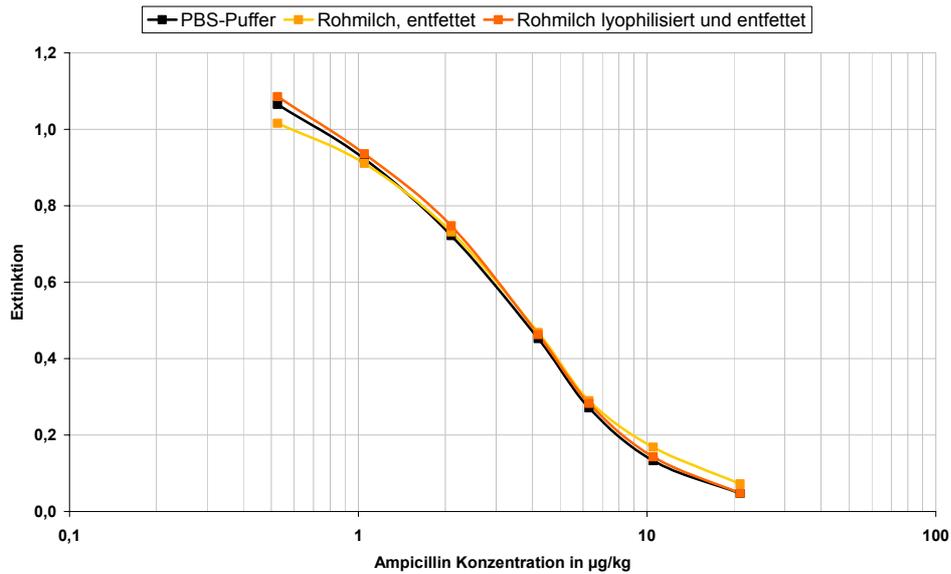


Abbildung 62: Einflüsse der unterschiedlichen Probenbehandlung (Lyophilisierung, Entfettung)

6.5.1.2 Konsummilch

Für die Untersuchung von Konsummilch wurde Vollmilch 3,5 %, fettarme Milch 1,5 % und beide Milchtypen nach Entfettung mittels Zentrifugation verwendet. Es zeigte sich derselbe Matrixeffekt, der schon bei der Rohmilch beobachtet worden ist.

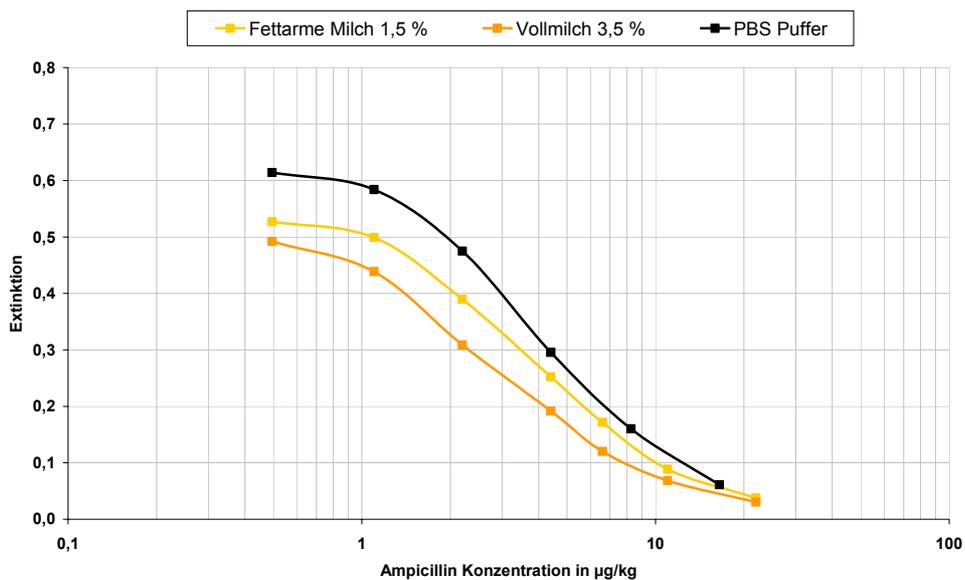


Abbildung 63: Matrixeinflüsse verursacht durch Vollmilch 3,5 % Fettgehalt und Fettarmer Milch 1,5 % Fettgehalt. Die beiden Kalibrierkurven der entfetteten Milchtypen wurden nicht in das Diagramm eingefügt, da sie die Daten der PBS-Kalibrierung teilweise überlagerten wie dies auch in Abbildung 62 der Fall ist.

Mit Abnahme des Fettgehalts nahm auch der beobachtete Matrixeffekt ab. Nach vollständiger Entfettung stimmten die erhaltenen Kalibrierkurven mit der PBS-Kurve überein. Die Entfettung der Konsummilchproben musste jedoch aufgrund der vorangegangenen Homogenisierung bei stärkerer Zentrifugation erfolgen, um den gleichen Grad der Entfettung zu erhalten wie bei Rohmilch.

6.5.1.3 Ziegenmilch

Die direkte Untersuchung von Ziegenmilch aus dem Lebensmittelhandel (Fettgehalt: 3,3 %) zeigte keinen Unterschied zu einer Konsummilch mit einem Fettgehalt von 3,5 %. Auch hier konnte der Matrixeffekt durch Entfettung eliminiert werden.

6.5.1.4 Zusammenfassung der Milchuntersuchungen

Die Untersuchung der Milchproben zeigte, dass bei der Verdünnung der Rohmilchproben in geringen Milchkonzentrationen die Extinktionen gegenüber der PBS Puffer-Kurve leicht erhöht waren. Dieser Effekt wurde auch schon von Märtlbauer bei der Entwicklung von Enzymimmuntests beobachtet [182]. Ein geringer Milchanteil in der Messlösung hatte anscheinend auf das PBP 2x* gegenüber einer reinen PBS-Pufferlösung (wie bei Märtlbauer (S. 176) auf das Markerenzym) einen stabilisierenden Effekt. Der Fettgehalt scheint bei Milch der Parameter zu sein, der den Matrixeffekt verursacht, da eine Entfettung der Milch den Matrixeffekt eliminierte.

6.5.2 Muskelfleisch

Bei der Analyse von Muskelfleisch ging immer ein Zentrifugationsschritt (4260 x g, 5 min, RT) voraus, da die Washernadeln durch Zellfragmente leicht verstopften.

6.5.2.1 Schwein

Zur Bestimmung des Matrixeinflusses von magerem Muskelfleisch vom Schwein wurde der Tausaft, wie unter 9.5.6 beschrieben, gewonnen und anschließend zur Erfassung des Matrixeffekts verfahren, wie bei Rohmilch beschrieben.

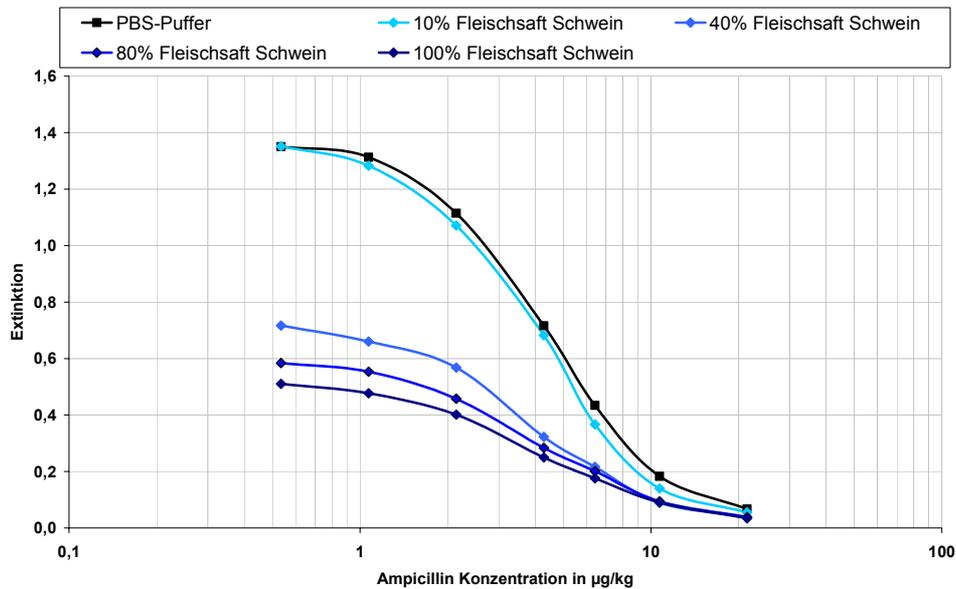


Abbildung 64: Matrixeinfluss Schweinefleisch

Bei der Matrixuntersuchung des Tausaftes, gewonnen aus dem Muskelfleisch von 6 Schweinen unterschiedlicher Herkunft, konnte gezeigt werden, dass kein Einfluss aus der unterschiedlichen Herkunft der Schweine resultierte, da sowohl die Extinktionen der Proben der einzelnen Schweine als auch die Extinktion einer gepoolten Probe aus den 6 individuellen Proben übereinstimmende Werte lieferten. Der auftretende Matrixeffekt konnte eliminiert werden, wenn der Tausaft mit PBS Puffer verdünnt worden ist (10 % Fleischsaftanteil). Wegen der hohen Sensitivität des Mikrotiterplattentests konnten die β -Lactame trotz der Verdünnung an ihrem jeweiligen MRL detektiert werden.

6.5.2.2 Rind

Mageres Muskelfleisch vom Rind zeigte im Gegensatz zu Schweinefleisch einen stärkeren Matrixeffekt, der auch durch eine 10-fache Verdünnung des zentrifugierten Tausaftes nicht eliminiert werden konnte. Zwar führten noch höhere Verdünnungen zu einer stärkeren Reduktion des Matrixeffekts, jedoch war dieses für die Praxis nicht anwendbar, da die Testsensitivität für eine Untersuchung am MRL nicht mehr ausreichte.

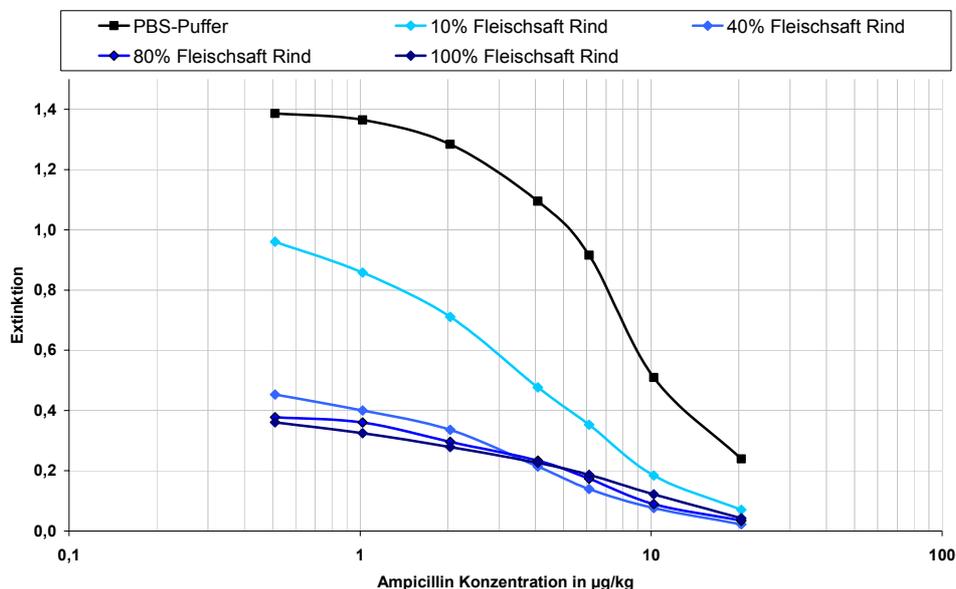


Abbildung 65: Matrixeinfluss Rindfleisch

Durch einen zusätzlichen Waschschrift zwischen Probeninkubation und DIG-AMPI-Zugabe ließ sich der Matrixeffekt ebenfalls nicht eliminieren. Zur Identifizierung von positiven Proben musste deshalb bei der Untersuchung von Rindfleisch eine Matrixkontrollprobe mitgeführt werden. Fleisch unterschiedlicher Rinder ($n = 3$) führte zu keinem erkennbaren Unterschied im Testergebnis.

6.5.2.3 Hirsch

Hirschfleisch zeigte im Vergleich zu Rind- und Schweinefleisch den stärksten Matrixeffekt. Hier führten diese jedoch nicht zu einer Verminderung der Extinktionswerte, sondern zu einer Erhöhung. So lagen auch bei einer 10 %igen Fleischsaftlösung die Extinktionen immer noch oberhalb der Standardkalibrierkurve. Es lag die Vermutung nahe, dass im Hirschfleisch Proteine oder Gewebereste dafür verantwortlich waren und DIG-AMPI unspezifisch daran gebunden und durch den nachfolgenden Waschschrift nicht entfernt wurde. Eine mikroskopische Untersuchung des gewonnenen Fleischsaftes ergab eine große Menge an Zell- und Geweberesten, die auch durch die Zentrifugation nicht entfernt werden konnten.

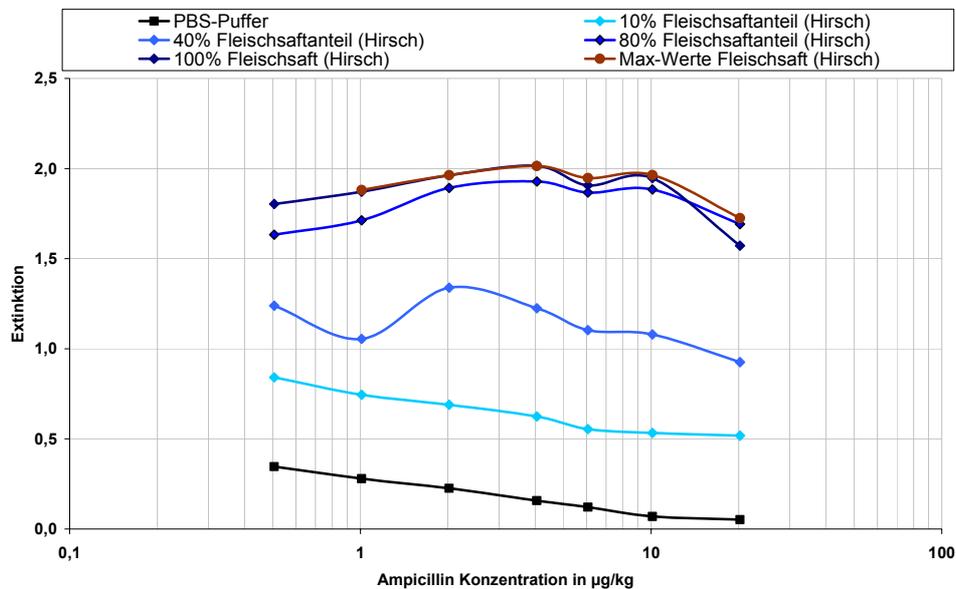


Abbildung 66: Matrixeinfluss Hirschfleisch

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 67 noch einmal die Kalibrierkurve des 10 %igen Hirschausafte und des PBS Puffers dargestellt. Die Färbereaktion musste bei dieser Bestimmung schon nach 3 Minuten gestoppt werden, da die Kavitäten mit den Proben des Fleischsaftes schon nach kurzer Zeit sehr hohe Extinktionen aufwiesen und bei längerer Inkubation keine Auswertung mehr möglich gewesen wäre.

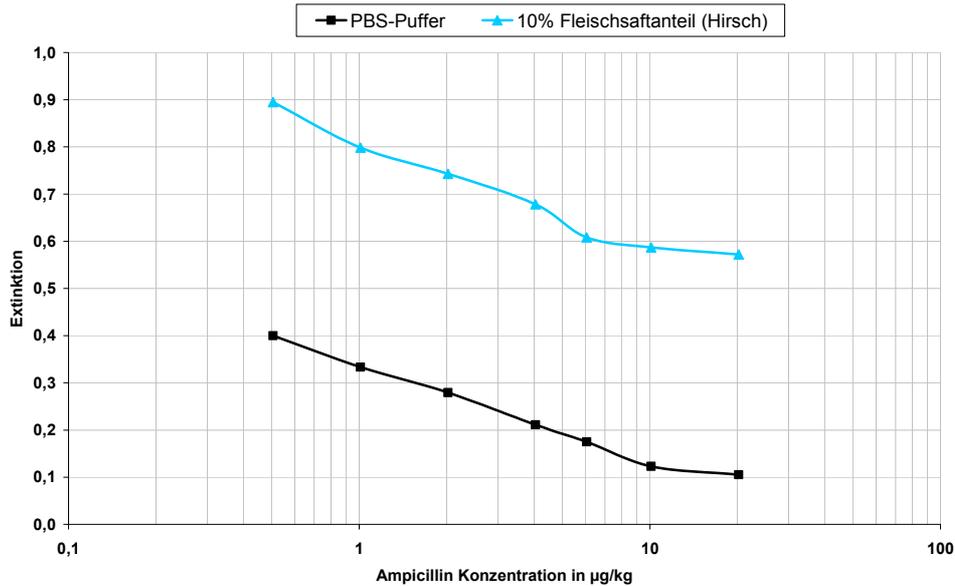


Abbildung 67: Matrixeinfluss Hirschfleisch – Vergleich 10-fache Verdünnung und Puffer

Es zeigt sich, dass bei der 10-fachen Verdünnung schon eine Kalibrierkurve zu erahnen ist, jedoch eine Auswertung aufgrund der unspezifischen Bindungen nicht möglich wäre. Aus diesem Grunde wurden unterschiedliche Aufarbeitungen für die Probe gewählt und miteinander verglichen. Zum einen wurde ein Waschschrift zwischen der Inkubation mit Penicillin und der DIG-AMPI- Zugabe eingefügt, zum anderen der Fleischsaft membranfiltriert.

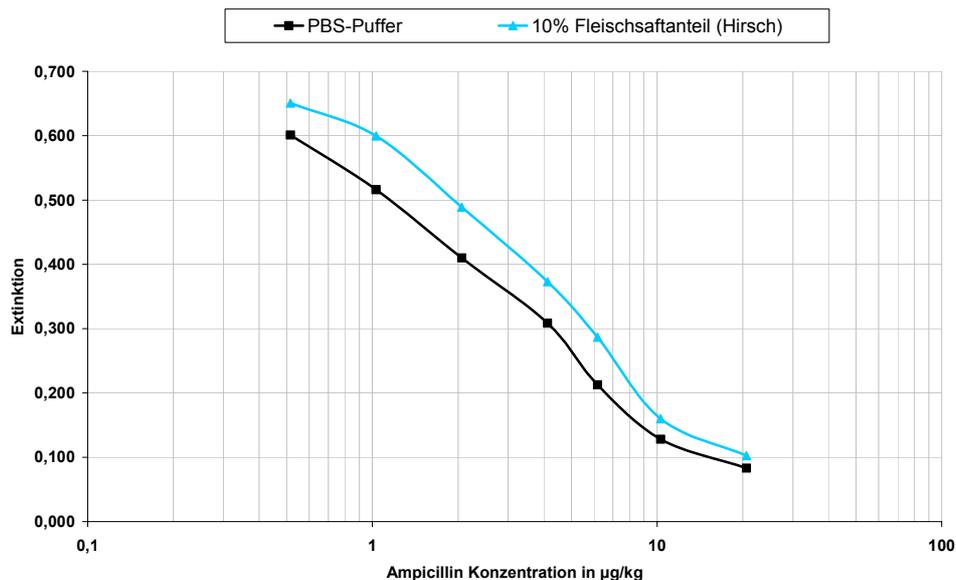


Abbildung 68: Matrixeinfluss Hirschfleisch nach zusätzlichem Waschschrift mit PBS Puffer vor DIG-AMPI-Zugabe

Der zusätzliche Waschschrift führte zu einer starken Reduktion des Matrixeinflusses, jedoch lagen die Extinktionswerte immer noch oberhalb der PBS-Werte.

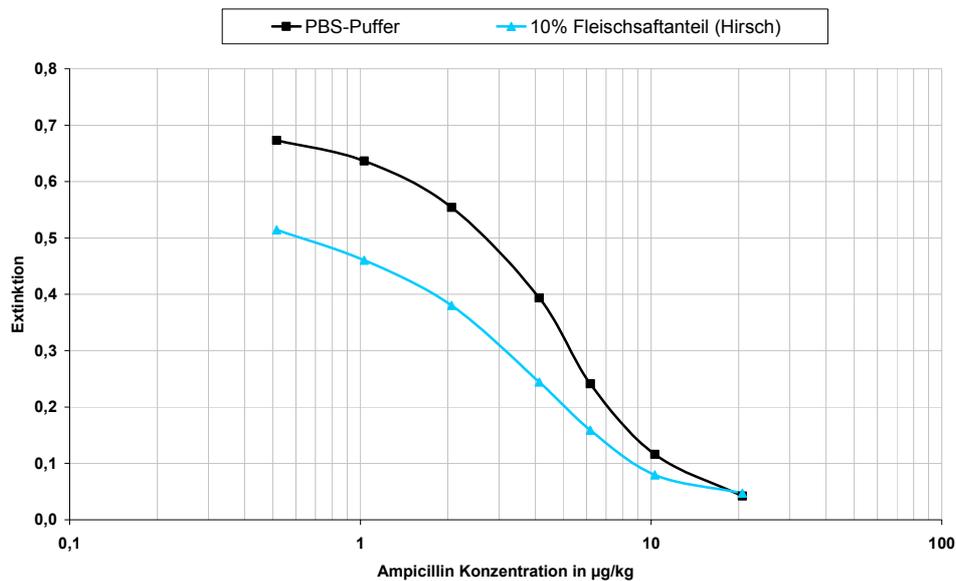


Abbildung 69: Matrixeinfluss Hirschfleisch nach 0,45 µm Membranfiltration

Die Membranfiltration führte zu einer Eliminierung der wahrscheinlich stattfindenden unspezifischen Bindungen der Reaktionspartner an Zell- und Gewebereste, was daran zu erkennen war, dass die Matrixkurve nun unterhalb der PBS Puffer-Kurve lag.

Beide Möglichkeiten lieferten eine Reduktion der Matrixeffekte, wobei sich jedoch die Membranfiltration als die effektivere Variante erwies, wie Abbildung 69 veranschaulicht.

Da die Membranfiltration mittels eines 0,45 µm Filters nicht ausreichte, um die Matrixeffekte komplett zu eliminieren, wurde der Fleischsaft zusätzlich mittels eines 0,22 µm Filters membranfiltriert. Es zeigte sich, dass auch bei einer Membranfiltration mit geringerem Porendurchmesser keine Eliminierung der Matrixeffekte erreicht werden konnte. Auch die Kombination von Membranfiltration und einem zusätzlichen Waschschrift führte zu keiner signifikanten Verbesserung. Die Vermutung lag nahe, dass ein Bestandteil des Fleischsafts zu einer Inhibierung, einer Zugangsbehinderung oder einer Denaturierung des PBP führt und somit die geringere Extinktion bei der Kalibrierung mit Tausaft, verglichen mit der PBS Puffer-Kalibrierung, verursacht. Ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der

Probenmatrix (der Tausaft des Hirschfleischs wies den geringsten pH-Wert auf; siehe Anhang 4) und des Matrixeffektes, wie erst vermutet wurde, bestand jedoch nicht. Eine Überprüfung mittels einer Standard-Kalibrierkurve in PBS-Puffer, dessen pH-Wert zuvor auf 5,2 gesenkt wurde (pH vom Tausaft des Hirschfleischs), verglichen mit einer Standard-Kalibrierkurve in PBS-Puffer pH 7,3 zeigte keinen Einfluss auf den Mikrotiterplattentest. Das gleiche gilt für den Einfluss von Fe(II)- und Fe(III)- Ionen. Auch hier zeigte ein Zusatz dieser beiden Ionen zum PBS-Puffer keinen Einfluss auf den Test, so dass ein Einfluss durch einen erhöhten Eisengehalt im Fleischsaft, wie zuerst vermutet wurde, ausgeschlossen werden konnte.

6.5.2.4 Pute

Die Untersuchung vom Muskelfleisch der Pute zeigte ein ähnliches Bild wie die Untersuchung des Schweinefleischs. Auch hier konnte eine völlige Eliminierung des Matrixeinflusses durch eine zehnfache Verdünnung des Tausafts erreicht werden. Zur Gewinnung des Tausaftes mussten im Vergleich zu den anderen Fleischsorten die doppelte Menge Putenfleisch eingesetzt werden, um ausreichend Tausaft für die Kalibrierung zu erhalten. Zwei Tausäfte, gewonnen aus Muskelfleisch von Puten unterschiedlicher Herkunft, sind im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden. Bei diesen beiden Proben war keine Unterscheidung bezüglich ihrer Matrixinterferenzen möglich.

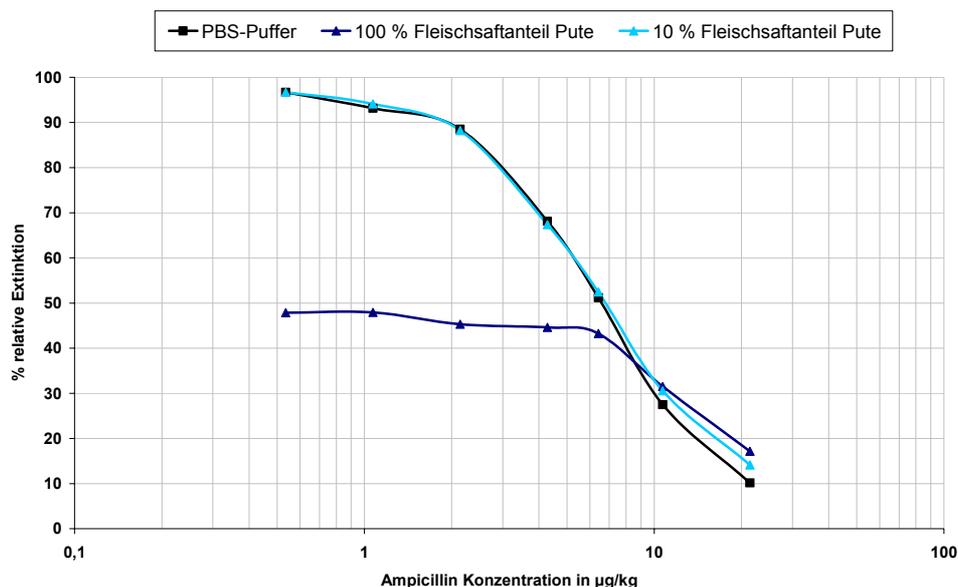


Abbildung 70: Matrixeinfluss Geflügelfleisch (Pute)

6.5.2.5 Zusammenfassung der Untersuchungen des Muskelfleisches

Der Tausaft aller Fleischsorten wurde zu Beginn zentrifugiert, um Zellbestandteile, die die Washernadeln verstopfen konnten, zu entfernen. Auffällig war bei den Untersuchungen, dass die hellen Fleischsorten zwar einen Matrixeinfluss auf das Testsystem zeigten, jedoch dieser durch eine zehnfache Verdünnung mit PBS Puffer eliminiert werden konnte. Bei den dunklen Fleischsorten (Rind- und Hirschfleisch) konnten dagegen die Matrixeinflüsse nicht durch Verdünnung eliminiert werden. Auch das Einfügen eines zusätzlichen Waschschriffs führte zu keiner signifikanten Verbesserung. Bei der Untersuchung des Hirschfleisches wurde zudem der Einfluss des pH-Werts und der Einfluss von Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen untersucht. Dabei wurde vermutet, dass die Eisen-Ionen aus dem sich bildenden Metmyoglobin das PBP inhibieren. Intensiv hellrotes Fleisch enthält nur ungefähr 30 % Metmyoglobin, wobei rötlich-braunes Fleisch schon 60-70 % Metmyoglobin enthält [189]. Dieses würde die erhaltenen Ergebnisse aus den Untersuchungen von hellem und dunklem Fleisch erklären. Die Analysen mit Pufferkalibrierungen, die Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen enthielten, zeigten jedoch keinerlei Beeinflussung des Testergebnisses. Die erhaltenen Kalibrierkurven stimmten mit den Kalibrierkurven, die in PBS Puffer angesetzt waren, überein. Bei Puten- und Schweinefleisch war eine direkte Analyse nach zehnfacher Verdünnung möglich und es war keine Matrixkalibrierung zur Ermittlung eines positiven bzw. negativen Befundes nötig, da die PBS-Kalibrierung kann in diesem Fall als Referenz herangezogen werden konnte. Bei Rind- und Hirschfleisch war jedoch eine Matrixkalibrierung aufgrund der starken Matrixeffekte für eine Entscheidung nötig. Bei Hirschfleisch musste neben der Verdünnung außerdem noch eine Membranfiltration in einem ersten Schritt durchgeführt werden.

6.5.3 Honig

Für die Matrix Honig ist kein MRL-Wert festgelegt, so dass β -Lactame nicht zur Behandlung von Bienen eingesetzt werden und somit in Honig nicht nachweisbar sein dürfen. Die β -Lactam Antibiotika sind zwar für die Behandlung von Bienen nicht zugelassen, jedoch war die Untersuchung der komplexen Matrix Honig und der Einfluss auf den Mikrotiterplattentest sehr interessant. Es konnten keine Unterschiede bei der Verwendung von dunklem Wald- und hellem Gebirgsblütenhonig festgestellt werden. Bei einer 1:1-Verdünnung wurde ein geringer Matrixeffekt detektiert. Dieser auftretende Matrixeffekt konnte durch die zehnfache Verdünnung des Honigs komplett eliminiert werden.

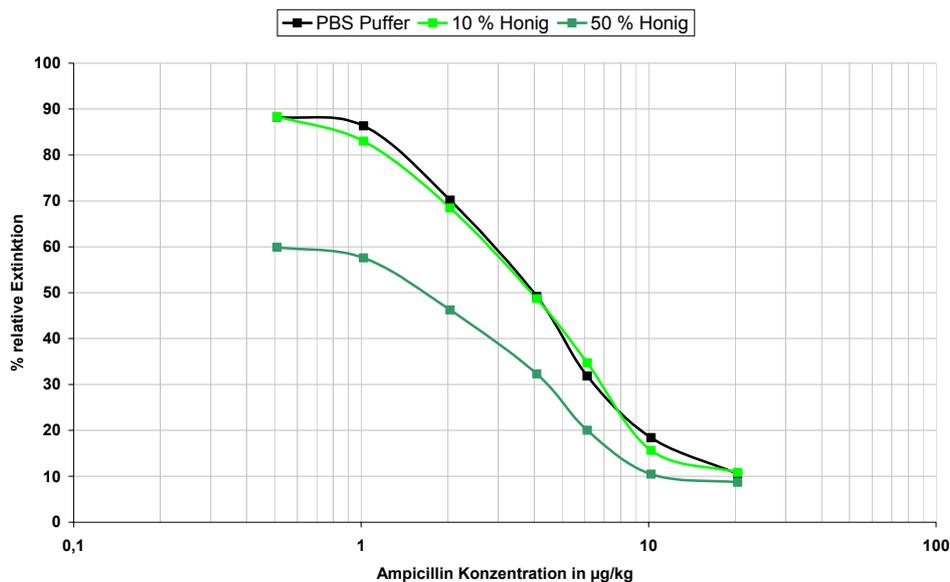


Abbildung 71: Einfluss der Matrix Honig. Dargestellt sind die Ergebnisse eines aus dem Lebensmittelhandel erworbenen Gebirgsblütenhonigs.

6.5.4 Ei

Auch für Ei ist kein MRL-Wert festgelegt, aber auch dieses tierische Lebensmittel ist aufgrund seiner komplexen Matrix für die Untersuchung sehr interessant. Es konnte bei der Analyse der unterschiedliche Einfluss der einzelnen Ei-Bestandteile gezeigt werden. So stellte der Matrixeffekt von Vollei die Summe aus den Matrixeffekten von Eiklar und Eigelb dar. Den geringsten Matrixeffekt wies dabei das Eigelb auf. Dieses ist für die Untersuchung auf β -Lactame sehr positiv, da diese sich bei Fütterung primär in der lipophilen Matrix anreichern würden [190]. Das lysozymhaltige Eiklar zeigte den stärksten Matrixeffekt, der auch nicht durch Verdünnung eliminiert werden konnte.

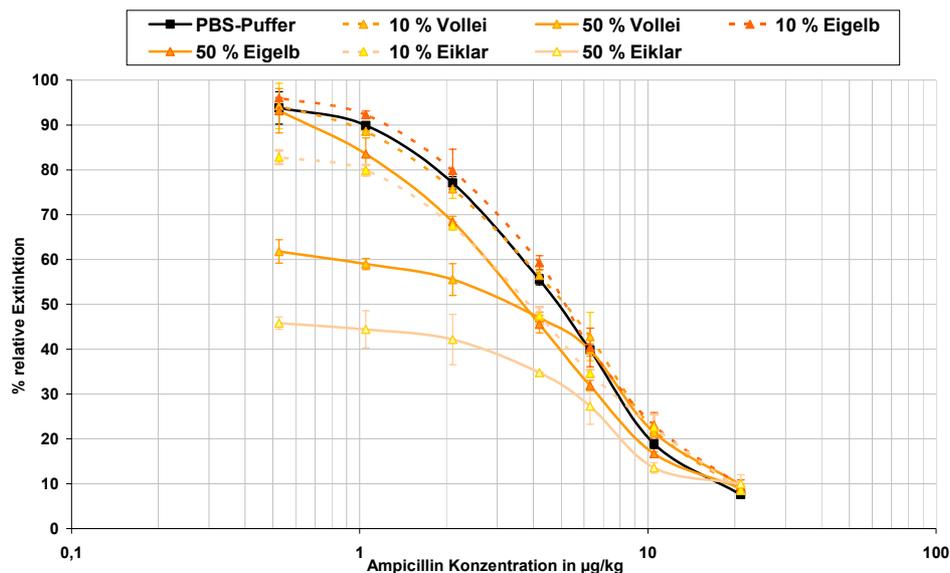


Abbildung 72: Matrixeinflüsse von Vollei, Eiklar und Eigelb

Insgesamt war es möglich die Matrixeffekte bei Vollei und Eigelb durch eine zehnfache Verdünnung mit PBS Puffer zu eliminieren und Ampicillin bis zu einer Konzentration von 1 µg/kg nachzuweisen.

6.5.5 Zusammenfassung der Matrixuntersuchungen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der entwickelte Mikrotiterplattentest weder eine Probenanreicherung noch aufwendige Aufreinigungsschritte erfordert. Der Nachteil ist jedoch das Auftreten der oben beschriebenen Matrixeffekte. Die Matrixeffekte konnten durch Aufnahme einer Standardkalibrierkurve in PBS-Puffer und einer Kalibrierkurve in Probenextrakt quantifiziert werden. Bei Milch konnte eine Entfettung durch Zentrifugation die Matrixeffekte eliminieren. Für Vollei, Eigelb und Honig war eine zehnfache Probenverdünnung zur Eliminierung der Matrixeffekte ausreichend. Beim Tausaft des Schweine- und Putenfleischs konnte dies ebenfalls durch eine zehnfache Verdünnung mit PBS-Puffer erreicht werden, so dass wie bei vielen ELISA-Tests, die in der Praxis angewendet werden, die Probengehalte mittels einer Kalibrierkurve in Puffer ermittelt werden konnten. Schon geringe Matrixeffekte würden bei einer solchen Vorgehensweise eine zu hohe Rückstandsmenge in der Probe vortäuschen, gerade bei geringen Analytkonzentrationen, und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Es könnte versucht werden, den störenden Einfluss der Matrix durch Aufreinigungsschritte (wie Festphasenextraktion) zu entfernen, was jedoch den Arbeitsaufwand sehr stark erhöhen würde. Eine andere Möglichkeit ist die Aufnahme einer Standard-Kalibrierkurve in rückstandsfreier Probenmatrix, die der Probenmatrix der aktuellen Rückstandsprobe entspricht. Mit Hilfe dieser Methode konnten bei Rind- und Hirschfleisch selbst-dotierte Proben als positiv identifiziert werden.

6.6 Validierung des Testsystems für Rohmilch

Eine entwickelte und optimierte Screening-Methode kann nur dann in der Routineanalytik der amtlichen Lebensmittelüberwachung nach der Richtlinie 96/23/EG eingesetzt werden, wenn diese gemäß der Entscheidung der EU-Kommission 2002/657/EG validiert worden ist [143]. Das größte Einsatzgebiet für β -Lactam-Antibiotika ist das Milchvieh. Aus diesem Grund wurde das Testsystem gemäß der Validierungsprozedur für Screening-Methoden der Entscheidung der EU-Kommission 2002/657/EG für Rohmilch für 4 Verbindungen (Ampicillin, Benzylpenicillin, Cefoperazon und Cefquinom), für welche Proben aus Medikationsstudien zur Verfügung standen, validiert. Der Validierungsprozess beinhaltete die Bestimmung der Spezifität, der Richtigkeit, der Wiederfindung, der Wiederholpräzision (inter- und intraassay), der Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ und des Nachweisvermögens $CC\beta$.

6.6.1 Spezifität

Gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG müssen Analysenverfahren zwischen dem Analyten und eng verwandten Stoffen (Isomeren, Metabolite, Abbauprodukte, usw.) unterscheiden können. Dafür ist es nötig, eine geeignete Anzahl von repräsentativen Leerwertproben ($n \geq 20$) zu analysieren und auf den Matrixeffekt zu untersuchen. Außerdem muss festgestellt werden, ob das Vorhandensein zu einer fehlerhaften Identifizierung führt oder die Quantifizierung beeinflusst. Die Untersuchung von dotierten Milchproben mit dem Antibiotikum Colistin (wurde bei den in 6.7 beschriebenen Medikationsstudien neben Ampicillin eingesetzt) sowie mit den Penicilloinsäuren von Ampicillin und Benzylpenicillin ergab – wie bei der Verwendung des Rezeptorproteins PBP 2x* erwartet – keine Beeinträchtigung des Mikrotiterplattentests. Die ermittelten Extinktionen entsprachen den Extinktionen der Leerproben. Lediglich Proben, die mit intakten (biologisch aktiven) β -Laktam-Antibiotika dotiert waren, verursachten wie erwartet eine Abschwächung der Extinktion. In Tabelle 12 sind die relativen Extinktionswerte von 24 untersuchten Leerproben aufgeführt. Die Leerproben setzten sich dabei aus 18 verschiedenen Sammelmilchproben unterschiedlicher Landwirte, die die eigentliche

Zielmatrix darstellen, sowie aus 6 Einzelmilchproben von 6 Milchkühen eines Landwirtes zusammen und wurden mit den Extinktionen des PBS Puffers (n = 7), der den B₀-Wert lieferte, verglichen.

| Leerwertproben B/B ₀ in % (linke Spalte) + absolute Extinktion (rechte Spalte) | | | | | | | | PBS-Puffer |
|---|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|------------|
| 99,0 | 1,207* | 97,3 | 1,164 | 103,8 | 1,242 | 105,7 | 1,265 | 1,243 |
| 100,3 | 1,300 | 105,9 | 1,267* | 104,0 | 1,245 | 100,8 | 1,207 | 1,191 |
| 101,5 | 1,265* | 103,6 | 1,240 | 105,9 | 1,267 | 108,6 | 1,300 | 1,205 |
| 108,6 | 1,119 | 101,7 | 1,217* | 104,6 | 1,252 | 105,7 | 1,265 | 1,234 |
| 102,4 | 1,236 | 103,3 | 1,236 | 105,1 | 1,258* | 93,5 | 1,119* | 1,138 |
| 92,7 | 1,109 | 106,4 | 1,273 | 106,8 | 1,278 | 103,3 | 1,236 | 1,268 |
| | | | | | | | | 1,102 |
| Extinktionsbereich Leerwertproben: 92,7-108,6 % bzw. 1,119 – 1,300 | | | | | | | | |
| Mittelwert Leerwertproben: 102,9 % ± 4,0 % bzw. 1,232 ± 0,048 | | | | | | | | |
| Extinktionsbereich PBS Puffer: 1,102 – 1,268 | | | | | | | | |
| Mittelwert PBS Puffer: 1,197 ± 0,055 | | | | | | | | |

Tabelle 12: Wertetabelle Spezifität. Die Extinktionen der Rohmilch-Leerwertproben werden mit den Extinktionen des PBS-Puffers verglichen und als relative Extinktion angegeben. Die Schwankungen um 100 % sowie der direkte Vergleich der Extinktionen machen deutlich, dass kein Matrixeffekt beobachtet werden kann. * Diese Extinktionen wurden von den Einzelmilchproben verursacht.

Die 24 Rohmilchproben erwiesen sich als frei von β -Laktam-Rückständen.

6.6.2 Richtigkeit / Wiederfindung

Die Richtigkeit kann nur mittels eines zertifizierten Referenzmaterials (als CRM bezeichnet) bestimmt werden. Wenn ein solches nicht zur Verfügung steht erlaubt die EU-Entscheidung die Untersuchungen mit dotierter, zuvor rückstandsfreier, Matrix. 18 Aliquote eines Leerwertmaterials wurden entnommen und je 6 davon auf das 0,5-, 1- und 1,5-fache der zulässigen Höchstmenge dotiert. Die Dotierung sollte dabei die Eigenschaften der Probe möglichst nicht verändern, so dass wie in 9.5.4 beschrieben nur sehr kleine Mengen der Standardlösung zur Probe gegeben wurden. Die Proben wurden mittels des entwickelten und optimierten Mikrotiterplattentest analysiert, die Konzentrationen über die erhaltenen Extinktionen bestimmt und die Wiederfindung exemplarisch anhand von Ampicillin, die in Tabelle 13 dargestellt ist, berechnet. Die Ergebnisse für Benzylpenicillin, Cefquinom und Cefoperazon sind in Tabelle 14 eingetragen.

| | 2 µg/kg | 4 µg/kg | 6 µg/kg |
|-----------------------------------|--------------------------|---------|---------|
| | Wiederfindung (%) | | |
| | 98 | 108 | 102 |
| | 98 | 105 | 105 |
| | 100 | 103 | 100 |
| | 98 | 113 | 107 |
| | 98 | 105 | 107 |
| | 108 | 113 | 113 |
| | 98 | 108 | 102 |
| Mittelwert (%): | 100 | 108 | 106 |
| Standardabweichung: | 3,7 | 3,8 | 4,3 |
| Variationskoeffizient (%): | 3,7 | 3,6 | 4,1 |

Tabelle 13: Tabelle zur Wiederfindung von Ampicillin. Die Rohmilchproben wurden mit Ampicillin an dem für dieses β -Lactam festgelegten $\frac{1}{2}$ MRL, MRL und $1 \frac{1}{2}$ MRL dotiert, analysiert und die Wiederfindung berechnet. Die Werte der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten beziehen sich auf die prozentualen Werte für die Wiederfindung.

6.6.3 Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision konnte mit dem gleichen Probensatz bestimmt werden, wie die Wiederfindung. Zur Bestimmung der Intra- und Inter-Testgenauigkeit wurden die Proben zum einen auf zwei unterschiedlichen Platten an einem Tag und zum anderen an verschiedenen Tagen sowie durch eine weitere Person analysiert.

Für die Intra-Testgenauigkeit ergaben sich folgende Werte, wobei die Ergebnisse zur Wiederfindung ebenfalls in Tabelle 14 eingefügt sind. Die Intraassayvarianz gibt dabei Aufschluss über die Messwertstreuung einer Probe innerhalb eines Versuchsansatzes. Die Berechnung der Intraassayvarianz erfolgt nach folgender Formel und beschreibt das Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert:

$$V(\%) = \frac{S}{x} * 100$$

V(%) : Variationskoeffizient

S : Standardabweichung der Messwerte

x : arithmetischer Mittelwert

| β -Lactam | Wert | zugegebene Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ | Bereich in $\mu\text{g}/\text{kg}$ | Mittelwert | % Wiederfindung | Standardabweichung | Variationskoeffizient % |
|------------------|---------------------|---|------------------------------------|------------|-----------------|--------------------|-------------------------|
| Ampicillin | $\frac{1}{2}$ MRL | 2,0 | 2,0-2,2 | 2,0 | 100 | 0,08 | 4,0 |
| | MRL | 4,0 | 4,1-4,5 | 4,3 | 108 | 0,14 | 3,3 |
| | $1 \frac{1}{2}$ MRL | 6,0 | 6,0-6,8 | 6,3 | 106 | 0,25 | 4,0 |
| Benzylpenicillin | $\frac{1}{2}$ MRL | 2,0 | 1,8-2,1 | 2,0 | 100,0 | 0,11 | 5,6 |
| | MRL | 4,0 | 3,6-4,3 | 4,0 | 100,0 | 0,23 | 5,7 |
| | $1 \frac{1}{2}$ MRL | 6,0 | 5,4-6,1 | 5,8 | 97 | 0,26 | 4,6 |
| Cefquinom | $\frac{1}{10}$ MRL | 2,0 | 2,0-2,4 | 2,2 | 109 | 0,15 | 6,9 |
| | $\frac{1}{4}$ MRL | 5,0 | 4,5-5,2 | 4,9 | 97 | 0,20 | 4,1 |
| | $\frac{1}{2}$ MRL | 10,0 | 9,2-10 | 9,6 | 96 | 0,29 | 3,0 |
| Cefoperazon | $\frac{1}{2}$ MRL | 25,0 | 24-30 | 27,2 | 109 | 2,12 | 7,8 |
| | MRL | 50,0 | 46-53 | 49,2 | 98 | 2,41 | 4,9 |
| | $1 \frac{1}{2}$ MRL | 75,0 | 72-78 | 74,9 | 100 | 2,13 | 2,8 |

Tabelle 14: Intra-Testgenauigkeit ($\mu\text{g}/\text{kg}$): Dargestellt sind die Konzentrationen der dotierten Rohmilchproben, wobei für jedes β -Lactam je 6 rückstandsfreie Rohmilchproben auf das 0,5-, 1- und 1,5-fache der zulässigen Höchstmenge dotiert wurden. Der Bereich, in dem die erhaltenen Konzentrationen lagen ist in Spalte 4, der daraus resultierende Mittelwert in Spalte 5 angegeben. Zusätzlich sind der Mittelwert der Wiederfindung, der, wie bei 6.6.2 beschrieben, ermittelt wurde, die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient der Messwerte angegeben (beziehen sich auf die ermittelten Konzentrationen in $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Die Interassayvarianz zeigt dagegen den Grad der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen einer Probe bei verschiedenen Versuchsbedingungen (anderer Messtag, anderer Anwender) an. Für die Inter-Testgenauigkeit ergaben sich folgende Werte, die in Tabelle 15 zusammengestellt sind:

| β-Lactam | Wert | Mittelwert | | | Mittelwert aller Tests | % Wiederfindung | Standardabweichung | Variationskoeffizient % |
|------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|
| | | Tag 1, Platte 1, Anwender 1 | Tag 2, Platte 2, Anwender 1 | Tag 3, Platte 3, Anwender 2 | | | | |
| Ampicillin | ½ MRL | 2,0 | 2,1 | 2,3 | 2,1 | 102 | 0,12 | 5,7 |
| | MRL | 4,3 | 4,0 | 4,5 | 4,3 | 105 | 0,21 | 4,9 |
| | 1 ½ MRL | 6,3 | 6,5 | 6,8 | 6,5 | 104 | 0,21 | 3,2 |
| Benzylpenicillin | ½ MRL | 2,0 | 1,9 | 2,2 | 2,0 | 102 | 0,13 | 6,1 |
| | MRL | 4,0 | 3,9 | 4,3 | 4,1 | 102 | 0,17 | 4,2 |
| | 1 ½ MRL | 5,8 | 6,0 | 6,2 | 6,0 | 100 | 0,16 | 2,7 |
| Cefquinom | 1/10 MRL | 2,2 | 2,3 | 1,9 | 2,1 | 106 | 0,17 | 7,9 |
| | ¼ MRL | 4,9 | 5,2 | 5,0 | 5,0 | 101 | 0,14 | 2,7 |
| | ½ MRL | 9,6 | 9,8 | 10,3 | 9,9 | 99 | 0,28 | 2,9 |
| Cefoperazon | ½ MRL | 27,2 | 25,3 | 26,8 | 26,4 | 106 | 0,81 | 3,1 |
| | MRL | 50,1 | 51,2 | 52 | 50,8 | 102 | 1,19 | 2,4 |
| | 1 ½ MRL | 74,9 | 75,9 | 73,3 | 74,7 | 100 | 0,66 | 1,4 |

Tabelle 15: Inter-Testgenauigkeit (µg/kg): Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen der dotierten Rohmilchproben, die an verschiedenen Tagen auf verschiedenen Platten und durch verschiedene Anwender ermittelt wurden. Der aus allen Tests resultierende Mittelwert ist in Spalte 6 angegeben. Zusätzlich sind der Mittelwert aller Wiederfindungen, die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient der Messwerte angegeben (beziehen sich auf die Mittelwerte der ermittelten Konzentrationen in µg/kg).

6.6.4 Entscheidungsgrenze CC α und Nachweisvermögen CC β

Die Entscheidungsgrenze CC α wurde abgeschätzt, indem 20 Leerwertproben von unterschiedlicher Herkunft (aus Rohmilch von sechs verschiedenen Bauernhöfen, die auch schon für die Bestimmungen bei 6.6.1 eingesetzt wurde), die mit dem Analyt an seinem Grenzwert (z.B. Ampicillin bei 4 µg/kg) dotiert waren, analysiert wurden. Die Konzentration am zulässigen Grenzwert plus dem 1,64-fachen der entsprechenden Standardabweichung ist dann gleich der Entscheidungsgrenze. Der ermittelte CC α -Wert beläuft sich für Ampicillin auf 4,3 µg/kg.

Das Nachweisvermögen wurde ebenfalls bestimmt, indem die oben beschriebenen 20 Leerwertproben mit dem Analyt in der Konzentration der Entscheidungsgrenze dotiert und im Anschluss analysiert wurden. Der Wert der Entscheidungsgrenze plus dem 1,64-fachen der entsprechenden Standardabweichung ist dann gleich dem Nachweisvermögen. Die ermittelten CC β -Werte (z.B. Ampicillin: 4,7 µg/kg) sind in Tabelle 16 angegeben und liegen knapp oberhalb der MRL-Werte.

| | Ampicillin | Benzylpenicillin | Cefquinom* | Cefoperazon |
|------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| CCα | 4,3 | 4,4 | - | 52,1 |
| CCβ | 4,7 | 4,8 | - | 55,9 |

Tabelle 16: Ermittelte CC α - und CC β -Werte für die 4 untersuchten β -Lactam-Antibiotika. *Für Cefquinom konnte kein CC α - und CC β -Wert bestimmt werden, da die hohe Testsensitivität eine Bestimmung am MRL unmöglich machte.

6.6.5 Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze (limit of detection = LOD) des Verfahrens ist die kleinste Konzentration, die sich mit ausreichender statistischer Sicherheit qualitativ noch erfassen lässt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde mit den β -Lactamen jeweils eine Kalibrierkurve in entfetteter Rohmilch erstellt. Zudem wurden mindestens 6 Milchblanks zur Ermittlung des B_0 -Wertes aufgenommen und die Standardabweichung bestimmt. Die Standardabweichung und der sich aus den B_0 -Werten ergebende Mittelwert wurden zur Ermittlung der Nachweisgrenze herangezogen. Die Nachweisgrenze wurde dann aus dem Mittelwert der Leerproben abzüglich der dreifachen Standardabweichung berechnet und ergibt sich aus dem Vergleich mit den Kalibrierstandards. Die Nachweisgrenze ist dabei für jedes β -Lactam individuell zu bestimmen, da nicht nur die Matrix-Interferenzen, sondern vor allem die unterschiedliche Affinität des PBP 2x* gegenüber den Penicillinen und Cephalosporinen einen Einfluss auf diese ausübt. Eine Beispielberechnung zur Ermittlung der Nachweisgrenze für Ampicillin ist in Tabelle 17 gezeigt (Vergleich auch Abbildung 44). Die so ermittelten Nachweisgrenzen sind anschließend in Tabelle 18 zusammengefasst.

Beispielberechnung zur Ermittlung der Nachweisgrenze für Ampicillin:

| | | Ergebnisse der Kalibrierung | |
|---|--------------|--|-----------------------|
| | | Ampicillin-Konzentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | % relative Extinktion |
| Extinktion der rückstandsfreien Rohmilchproben | 0,892 | 20,60 | 4,79 |
| | 0,941 | 10,30 | 7,24 |
| | 1,074 | 8,24 | 7,97 |
| | 0,915 | 6,18 | 15,38 |
| | 0,882 | 4,12 | 27,69 |
| | 0,957 | 2,06 | 55,60 |
| | 0,866 | 1,03 | 78,17 |
| Mittelwert B_0 : | 0,932 | 0,52 | 83,13 |
| Mittelwert B_0 – Reagenzienleerwert (0,035): | 0,897 | 0,10 | 88,62 |
| Standardabweichung: | 0,065 | | |
| 3-fache Standardabweichung: | 0,195 | | |
| NWG (B_0 – 3-fache Standardabweichung): | 0,702 | | |
| B/ B_0 *100 = % relative Extinktion: | 78,26 | | |

Tabelle 17: Beispielberechnung zur Ermittlung der Nachweisgrenze. Die grün-hervorgehobenen Werte zeigen die Übereinstimmung der relativen Extinktionen und der rot-hervorgehobene Wert, die daraus ermittelte Konzentration für die Nachweisgrenze an.

Es ergaben sich für die untersuchten Penicilline und Cephalosporine folgende Nachweisgrenzen:

| Penicillin | MRL-Wert für Milch ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Nachweisgrenze ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|-------------------------|--|--|
| Ampicillin | 4 | 1 |
| Benzylpenicillin | 4 | 0,85 |
| Amoxicillin | 4 | 0,85 |
| Cloxacillin | 30 | 19 |
| Dicloxacillin | 30 | 8,2 |
| Oxacillin | 30 | 4 |
| Nafcillin | 30 | 0,85 |
| Phenoxymethylpenicillin | - | 1,3 |
| Cefacetril | 125 | 19 |
| Cefalexin | 100 | 100 |
| Cefalonium | 20 | 250 |
| Cefapirin | Summe: | 1,6 |
| Desacetylcefapirin | 60 | 5,5 |
| Cefazolin | 50 | 10,5 |
| Cefoperazon | 50 | 25 |
| Cefquinom | 20 | 1,2 |
| Ceftiofur | 100 | 2,0 |

Tabelle 18: Ermittelte Nachweisgrenze aller in Rohmilch untersuchten β -Lactam-Antibiotika im Vergleich zu dem festgelegten MRL für Milch

6.6.6 Verdeckte Kontrollanalysen

Es wurden verdeckte Kontrollanalysen zur Absicherung der Ergebnisse vorgenommen, um eine Voreingenommenheit bzw. die subjektive Betrachtungsweise des Analytikers auszuschließen. Die Dotierung der rückstandsfreien Rohmilchproben erfolgte aus diesem Grund von einer zweiten Person (wie in 9.5.4 beschrieben) und die in den Proben erhaltenen Konzentrationen wurden erst nach Abschluss der Auswertung bekanntgegeben. 20 Rohmilchproben wurden mit unterschiedlichen Gehalten an Ampicillin, Benzylpenicillin und Cefquinom in einem Bereich von 0-8 µg/kg sowie Cefoperazon in einem Bereich von 0-200 µg/kg dotiert und im Anschluß daran „blind“ (allerdings mit Kenntnis des zugesetzten β -Lactams) analysiert. Zur Analyse wurde die Rohmilch entfettet und gegen eine PBS-Kalibrierung die Konzentration in den Proben bestimmt. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

| β -Lactam | Probe | dotierte Konzentration (µg/kg) | gefundene Konzentration (µg/kg) | % Wiederfindung |
|------------------|-------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Ampicillin | 1 | 5,2 | 5,0 | 96 |
| | 2 | 2,3 | 2,3 | 100 |
| | 3 | 0 | < LOD | - |
| | 4 | 8,2 | 7,5 | 92 |
| | 5 | 5,2 | 5,1 | 97 |
| Benzylpenicillin | 6 | 2,8 | 2,5 | 89,3 |
| | 7 | 0 | < LOD | - |
| | 8 | 4,6 | 4,9 | 107 |
| | 9 | 8,2 | 8,2 | 100 |
| | 10 | 0 | < LOD | - |
| Cefquinom | 11 | 9,5 | 9,8 | 103 |
| | 12 | 6,2 | 6,3 | 102 |
| | 13 | 0 | < LOD | - |
| | 14 | 3,1 | 3,5 | 113 |
| | 15 | 2,0 | 1,8 | 90 |
| Cefoperazon | 16 | 3,2 | < LOD | - |
| | 17 | 0 | < LOD | - |
| | 18 | 78 | 80 | 103 |
| | 19 | 158 | 160 | 101 |
| | 20 | 53 | 50 | 94 |

Tabelle 19: Ergebnisse aus den verdeckten Kontrollanalysen

Es konnte gezeigt werden, dass weder falsch-negative noch falsch-positive Resultate ermittelt worden sind. Auch zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der dotierten und der gefundenen Konzentration. Dies zeigte, dass eine Quantifizierung möglich ist, wenn das in der Probe enthaltene β -Lactam bekannt ist.

6.7 Analyse von gewachsenen Rückständen in lyophilisierten Rohmilchproben

In der Routineanalytik sind Proben entweder rückstandspositiv oder rückstandsnegativ und das einzelne β -Lactam in der Probe ist nicht bekannt, so dass eine Quantifizierung nicht möglich ist. Zwar zeigten die Validierung und die Analyse von verdeckten Kontrollproben, dass der Test sich für die Routineanalytik eignen würde, jedoch sollte dies an Feld-Proben überprüft werden. Am Standort Kiel der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL) im Institut für Hygiene und Produktsicherheit wurde eine Medikationsstudie durchgeführt. Gesunden und kranken Milchkühen wurden Cefoperazon-, Cefquinom-, Ampicillin- oder Benzylpenicillin-haltige Präparate intramammär verabreicht, um u.a. Einflüsse von Melkfrequenz und Eutergesundheitsstatus auf die Dauer der Wartezeiten zu untersuchen. Aus diesen Versuchsreihen standen die gefriergetrockneten Milchproben zur Verfügung, deren β -Lactam-Gehalt per HPLC und anderen Screening-Verfahren in Kiel ermittelt worden ist. Weitere Informationen zu den analysierten Proben (Melkintervall, Behandlungszeitraum, etc.) sind der schon veröffentlichten Literatur zu entnehmen [191-193].

Es wurde das Testsystem auf zwei unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten überprüft. Zum einen zur Verwendung als qualitatives Screening-Verfahren und zum anderen für eine quantitative Bestimmung, wenn das eingesetzte β -Lactam bekannt ist. Die Proben wurden wie in 9.5.9 beschrieben aufgearbeitet und mit dem optimierten und dem für Ampicillin, Benzylpenicillin, Cefoperazon und Cefquinom validierten Test untersucht. Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen wurden erst nach Übermittlung der Ergebnisse, die mittels des Mikrotiterplattentests erhalten wurden, bekannt gegeben. Bei der Analyse der Milchproben mittels des entwickelten Mikrotiterplattentests konnte kein Extinktionsunterschied zwischen der Milch, die von kranken Kühen stammte und der Milch, die von gesunden Kühen stammte festgestellt werden.

6.7.1 Qualitatives Screening

Die Auswertung erfolgte nach folgendem Vorgehen: Ein Ergebnis sollte dann als falsch-positiv beurteilt werden, wenn bei einer Konzentration, die der Hälfte der Nachweisgrenze entspricht eine signifikante Abschwächung der Extinktion erhalten wurde. Dagegen sollte ein Ergebnis als falsch-negativ bewertet werden, wenn eine Konzentration, die dem Zweifachen der Nachweisgrenze entspricht, keine Abschwächung der Extinktion hervorgerufen hat [194]. Die Originalwerte sind in Anhang 3 zu finden.

Es wurden für Cefoperazon, Benzylpenicillin, Ampicillin und Cefquinom weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse erhalten.

Auch bei einer anderen Betrachtungsweise der Ergebnisse wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Proben ermittelt. Hierbei sollte ein Ergebnis als falsch-positiv beurteilt werden, wenn bei der HPLC-Analyse die Konzentration kleiner der Nachweisgrenze lag, jedoch beim Mikrotiterplattentest die ermittelte Konzentration oberhalb des festgelegten MRL lag. Dagegen sollte ein Ergebnis als falsch-negativ bewertet werden, wenn mittels der HPLC β -Lactam-Konzentrationen oberhalb des MRL ermittelt wurden, mit dem Mikrotiterplattentest jedoch kein β -Lactam nachgewiesen werden konnte (die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag).

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse zusammengefasst, die mit HPLC, Charm II- und dem Mikrotiterplattentest ermittelt worden sind. Dabei wurden Proben als positiv beurteilt, bei denen die ermittelten β -Lactam-Gehalte oberhalb des jeweiligen MRL lagen. Als negativ wurden die Proben deklariert, bei denen die ermittelten β -Lactam-Gehalte unterhalb des MRL lagen. Es zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Rezeptortestverfahren (Mikrotiterplatten- und Charm II-Test). Die HPLC-Ergebnisse stimmten ebenfalls bis auf drei Proben mit den Ergebnissen dieser beiden Verfahren überein. Die Proben wurden aufgrund der Abweichung noch einmal mittels des Beta-Star-Tests untersucht. Auch der Beta-Star-Test lieferte die gleichen Resultate wie die beiden anderen Rezeptortests.

Eine Erklärung für diese Abweichungen liegt im Alter und der Konzentration der Proben. Die ermittelten Gehalte liegen sehr nah beieinander (Werte in Tabelle 21

MTP: 3,8 µg/kg, HPLC: 4,3 µg/kg bzw. MTP: 2,7 µg/kg, HPLC: 4,5 µg/kg). Da die Rohmilch 2003 gewonnen und per HPLC untersucht, jedoch erst 2006 mittels Charm II und Mikrotiterplattentest untersucht worden ist, könnte trotz Lyophilisierung ein geringer Abbau des Ampicillins stattgefunden haben. Insgesamt zeigte sich jedoch anhand der quantitativen Daten (siehe Kap. 6.7.2), dass eine Lyophilisierung der Proben sehr gut für die Lagerung von Rohmilchproben geeignet ist und eine spätere Analyse der Proben ermöglicht.

Der β -Lactam-Gehalt der Probe, die mittels HPLC als negativ bestimmt wurde, lag knapp unterhalb des MRL-Wertes. Das HPLC-Verfahren weist im Gegensatz zu den verwendeten Rezeptortests eine aufwendigere Probenaufarbeitung auf. Der Mikrotiterplattentest benötigte nur eine minimale Probenaufarbeitung (Entfettung der Milchproben), der Charm II- sowie der Beta-Star-Test benötigten keine Probenaufarbeitung, so dass es mit diesen beiden Verfahren zu keinen Wirkstoffverlusten kommt, wie es eventuell bei der HPLC der Fall sein könnte. Da jedoch die direkte Untersuchung der Proben per HPLC am BfEL in Kiel stattgefunden hat und nicht selber durchgeführt wurde, können diesbezüglich keine Aussagen zu den möglichen Fehlerquellen getroffen werden.

| Analyt | Laufende Nr. aus Anhang III | Mikrotiterplattentest | HPLC | Charm II |
|------------------|-----------------------------|-----------------------|------|----------|
| Benzylpenicillin | 7 | neg. | neg. | neg. |
| | 11 | pos. | neg. | pos. |
| | 15 | neg. | neg. | neg. |
| | 23 | neg. | neg. | pos. |
| | 27 | pos. | pos. | pos. |
| | 29 | neg. | neg. | neg. |
| | 31 | pos. | pos. | pos. |
| | 33 | neg. | neg. | neg. |
| Ampicillin | 3 | neg. | neg. | neg. |
| | 15 | neg. | pos. | neg. |
| | 21 | neg. | pos. | neg. |
| | 26 | neg. | neg. | neg. |
| | 36 | neg. | neg. | neg. |
| | 38 | pos. | pos. | pos. |
| | 46 | neg. | neg. | neg. |
| | 48 | neg. | neg. | neg. |
| Cefquinom | 5 | pos. | pos. | pos. |
| | 16 | neg. | neg. | neg. |
| | 51 | neg. | neg. | neg. |
| | 55 | pos. | pos. | pos. |
| | 61 | neg. | neg. | neg. |
| | 76 | pos. | pos. | pos. |
| | 84 | neg. | neg. | neg. |
| | 101 | neg. | neg. | neg. |
| Cefoperazon | 10 | pos. | pos. | pos. |
| | 16 | pos. | pos. | pos. |
| | 23 | neg. | neg. | neg. |
| | 30 | neg. | neg. | neg. |
| | 50 | pos. | pos. | pos. |
| | 53 | neg. | neg. | neg. |
| | 62 | neg. | neg. | neg. |
| | 70 | neg. | neg. | neg. |

Tabelle 20: Zusammenstellung der Probenergebnisse. Dargestellt sind ausschließlich die Proben, bei denen der MRL per HPLC über- bzw. unterschritten wurde und ein Messwert aus allen drei Analysenverfahren existiert.

In Tabelle 21 sind noch einmal die tatsächlich ermittelten quantitativen Daten aus dem Mikrotiterplattentest und der HPLC-Analyse zusammengestellt. Die Charm II-Bestimmung erfolgte nur qualitativ.

| Analyt | Laufende Nr. aus Anhang III | Mikrotiterplattentest | HPLC |
|------------------|-----------------------------|-----------------------|-------|
| Benzylpenicillin | 7 | 2,3 | 1,8 |
| | 11 | 4,9 | 2,6 |
| | 15 | 1,2 | <LOD |
| | 23 | 1,0 | 1 |
| | 27 | > obere NWG | 7 |
| | 29 | ≤ NWG (1,0) | <LOD |
| | 31 | > obere NWG | 6,2 |
| | 33 | 1,9 | <LOD |
| Ampicillin | 3 | 0,93 | 2,4 |
| | 15 | 3,8 | 4,3 |
| | 21 | 2,7 | 4,5 |
| | 26 | 2,0 | <LOD |
| | 36 | < NWG | <LOD |
| | 38 | 4,5 | 9,1 |
| | 46 | 2,1 | 1,5 |
| | 48 | 2,8 | <LOD |
| Cefquinom | 5 | > NWG | 59,4 |
| | 16 | < NWG | <LOD |
| | 51 | < NWG | <LOD |
| | 55 | > NWG | 21,1 |
| | 61 | < NWG | <LOD |
| | 76 | > NWG | 38,9 |
| | 84 | < NWG | <LOD |
| | 101 | < NWG | 2,1 |
| Cefoperazon | 10 | > obere NWG | 163,6 |
| | 16 | 87 | 92,2 |
| | 23 | 29 | 23,1 |
| | 30 | < NWG | <LOD |
| | 50 | 155 | 131,5 |
| | 53 | < NWG | <LOD |
| | 62 | < NWG | <LOD |
| | 70 | < NWG | 12,8 |

Tabelle 21: Zusammenstellung der Probenergebnisse wie in Tabelle 19 mit den tatsächlich ermittelten Daten. Dargestellt sind ausschließlich die Ergebnisse der am BfEL in Kiel ermittelten HPLC-Daten und der Daten, die mittels des Mikrotiterplatten-Tests ermittelt wurden. Die Charm II-Auswertung erfolgte nur qualitativ.

6.7.2 Quantitative Bestimmung

Die Ergebnisse der Proben, die einen auswertbaren Messwert lieferten, wurden mit den mittels HPLC erhaltenen Ergebnissen verglichen. Die folgenden Abbildungen stellen die Ergebnisse graphisch dar.

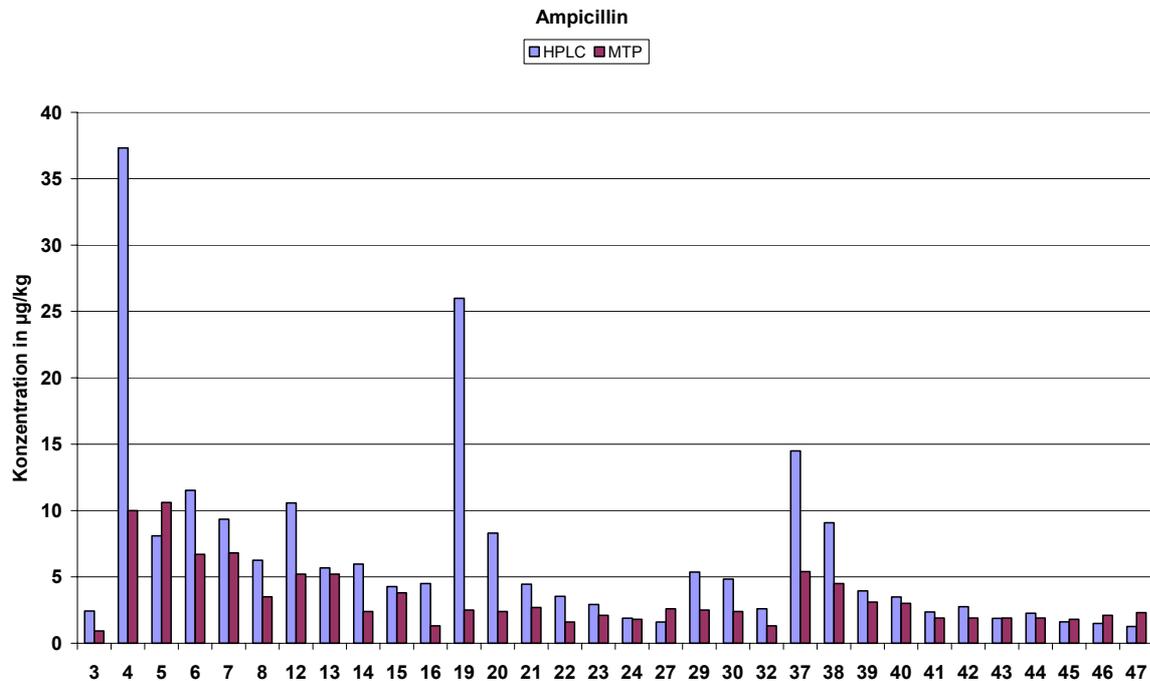


Abbildung 73: Ergebnisse aus den Ampicillin-haltigen Rohmilchproben. Die Nummerierung der Proben entspricht der laufenden Nummerierung der quantitativen Daten in Anhang III.

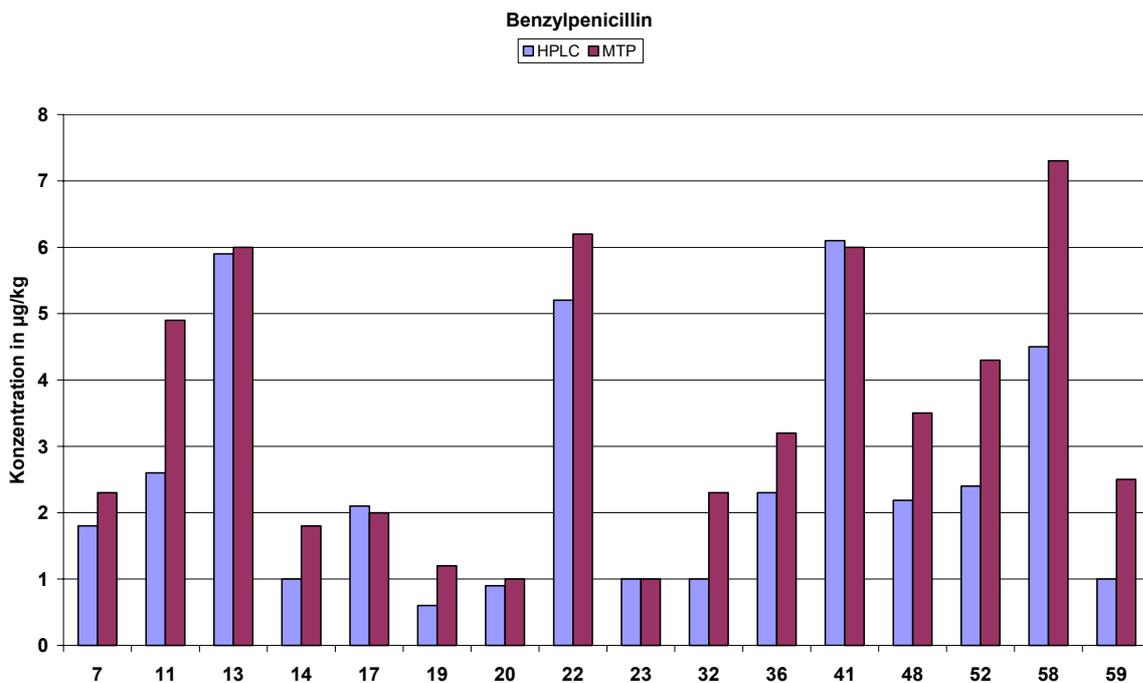


Abbildung 74: Ergebnisse aus den Benzylpenicillin-haltigen Rohmilchproben. Die Nummerierung der Proben entspricht der laufenden Nummerierung der quantitativen Daten in Anhang III.

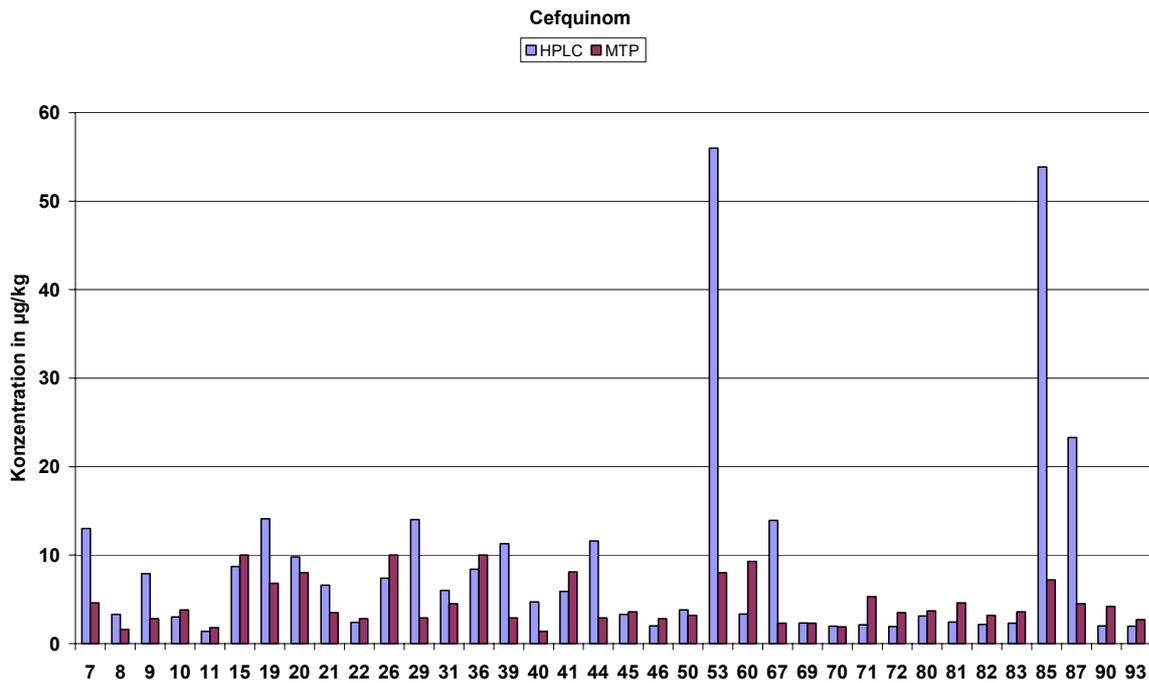


Abbildung 75: Ergebnisse aus den Cefquinom-haltigen Rohmilchproben. Die Nummerierung der Proben entspricht der laufenden Nummerierung der quantitativen Daten in Anhang III.

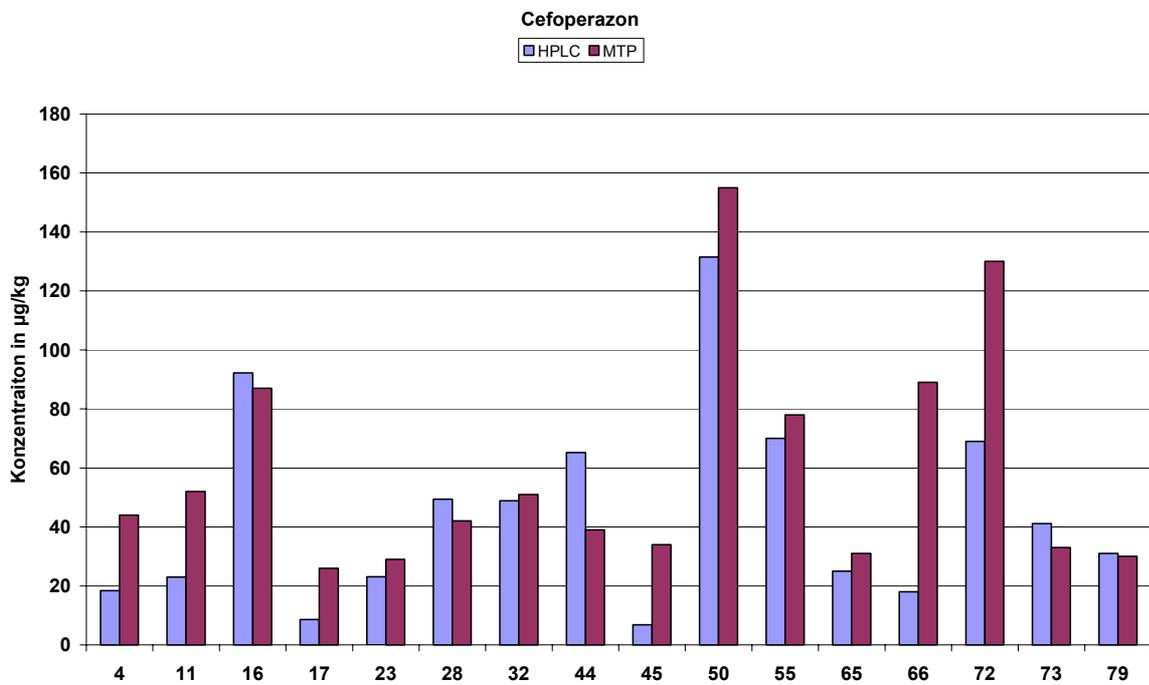


Abbildung 76: Ergebnisse aus den Cefoperazon-haltigen Rohmilchproben. Die Nummerierung der Proben entspricht der laufenden Nummerierung der quantitativen Daten in Anhang III.

Insgesamt ist eine gute Korrelation zwischen den mit HPLC untersuchten Proben und den mittels Mikrotiterplattentest untersuchten Proben zu erkennen, was den Schluß zulässt, dass der entwickelte Test auch zur Quantifizierung geeignet ist, sofern das vorliegende β -Lactam bekannt ist.

Auch zeigt der Vergleich der erhaltenen Resultate, dass sich eine Lyophilisierung sehr gut für die Lagerung von Rohmilchproben eignet. Die untersuchten Proben wurden 2003 gewonnen und nach drei Wochen Lagerung (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) lyophilisiert und bei $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (näheres siehe Kap. 9.5.9) bis sie 2006 rekonstituiert und analysiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass in den meisten Fällen kein nennenswerter Abbau stattgefunden hat, so dass eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen vorzufinden ist.

7. Schlussbetrachtung und Ausblick

Den Grundstein für diese Arbeit bildete das Penicillinbindende Protein PBP 2x* aus *Streptococcus pneumoniae*, das schon in einer vorausgegangenen Arbeit im Arbeitskreis zur Entwicklung eines Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Biosensor-Tests eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu dem bereits entwickelten instrumentellen Analysenverfahren, wurde ein kostengünstiger und apparativ nicht aufwendiger rezeptorproteingestützter (PBP 2x*) Mikrotiterplattentest für das Screening auf β -Lactame entwickelt.

Mit dem entwickelten Mikrotiterplattentest war es möglich 96 Proben parallel auf biologisch aktive β -Lactam-Antibiotika zu analysieren. Mittlerweile ist ein kommerziell erhältlicher ELISA für Penicilline auf dem Markt. Mit diesem Test ist es jedoch nicht möglich Cephalosporine nachzuweisen. Mit dem rezeptorproteingestützten Mikrotiterplattentest können dagegen alle in der EU zugelassenen, biologisch aktiven β -Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) erfasst werden.

Mit diesem Verfahren ist es möglich Milch-, Honig-, Ei- und Muskelfleischproben schnell und einfach zu analysieren. Außerdem stellt der Mikrotiterplattentest die ideale Ergänzung zur LC-MS/MS dar, wenn dieser als Screening-Test vor der Ergebnisabsicherung durch das chemisch-physikalische Analysenverfahren, wie der LC-MS/MS, verwendet wird.

Neben der Spezifität und der Empfindlichkeit wurde für die praktische Anwendung auch der Einfluss der Probenmatrix auf das Testsystem untersucht. Die Matrixeinflüsse von Milch, Honig, Eigelb, Vollei, Schweine- und Putenmuskelfleisch können durch Verdünnung in PBS-Puffer (bei Milch auch Entfettung) eliminiert werden. Eine Identifizierung dieser Proben als positiv oder negativ ist durch Mitführung einer Kalibrierung in PBS-Puffer möglich. Eine derartige Ja/Nein-Entscheidung kann auch gefällt werden, indem nur zwei Referenzkonzentrationen mitgeführt werden (Blank und Konzentration am MRL). Für Rind- und Hirschfleisch muss jedoch eine Matrixkalibrierung zur Identifizierung mitgeführt werden, da eine Eliminierung der Matrixeffekte durch Verdünnung nicht erreicht werden kann.

Bis auf Cefalonium können aufgrund der hohen Testempfindlichkeit alle β -Lactame, die in der EU zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen sind, an ihrem jeweiligen MRL nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit des Testes könnte noch durch die Verwendung von Bocillin FL als Kompetitionspartner und Einsatz eines Fluoreszenzreaders zur Detektion sowie durch Ausnutzung anderer Lumineszenz-Reaktionen zur Detektion gesteigert werden.

Insgesamt hat das entwickelte Testsystem das Potential zu einem Screening-Test für den Einsatz in der Routineanalytik zu avancieren. Es bietet sich an Laborvergleichsstudien durchzuführen, um zu klären, ob sich eine Übertragung in ein anderes Labor auf die Testparameter auswirkt. Es bedarf zudem noch der Klärung, ob eine Lagerung von mit PBP 2x*-beschichteten Platten sinnvoll ist oder der Einsatz im Routinebetrieb eine Beschichtung mit PBP 2x* empfiehlt. Es bietet sich außerdem an den Test auch für den Einsatz bei andere Fleischarten und Matrices (wie Futtermittel) zu überprüfen.

8. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein rezeptorproteingestützter Mikrotiterplattentest zur Rückstandsanalytik von β -Lactam-Antibiotika in verschiedenen Matrices entwickelt und mittels chemometrischen Experimental Design für die Matrix Milch optimiert. Als Rezeptor fungierte das Penicillin-bindende Protein PBP 2x*, das schon in einem SPR-Biosensor-Assay erfolgreich als biomolekularer Erkennungspartner eingesetzt worden ist. Die Vorteile in der Verwendung von PBP 2x* lagen in dem ausschließlichen Nachweis biologisch aktiver β -Lactame, für welche die Rückstandshöchstmengen festgelegt wurden, und in der Möglichkeit das Protein in großen Mengen zu exprimieren. Als Kompetitor fungierte in dem Test ein speziell für dieses Testsystem synthetisiertes Digoxigenin-markiertes Ampicillin (DIG-AMPI). Der Test basiert auf der Konkurrenz von β -Lactamen aus einer Probe und DIG-AMPI um die Bindestellen des PBP 2x*. Die gebildeten PBP 2x*/DIG-AMPI-Komplexe konnten mittels enzymmarkierter anti-Digoxigenin F_{ab} Fragmente nachgewiesen werden, wobei die resultierende Farbintensität indirekt proportional zum β -Lactam-Gehalt in der Probe war.

Zu Beginn wurde die Proteinexpression und -aufreinigung bezüglich der Ausbeute des Bindeproteins optimiert. Dazu wurden der Induktionszeitpunkt der Proteinexpression sowie die Durchführung der Glutathion-Affinitätschromatographie variiert. Es konnte die Ausbeute an Bindeprotein gegenüber der im Arbeitskreis vorausgegangenen Arbeit zur Nutzung von PBP 2x* in der Oberflächenplasmonresonanzanalyse verdreifacht werden.

Des Weiteren wurde die Lagerstabilität des Bindeproteins überprüft. Die Überprüfung mittels SDS-PAGE belegte die Stabilität des PBP 2x* für die beiden Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren. Mittels des entwickelten Mikrotiterplattentests ließ sich ebenfalls keine Veränderung bei der Bindungskapazität feststellen. Im Kühlschrank nahm die Bindekapazität von PBP 2x* dagegen innerhalb von sechs Monaten um 50 % ab. Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen wirkte sich ebenfalls negativ auf die Aktivität aus. Aus diesem Grund wurde das gewonnene PBP 2x* in 50 μl - bzw. 100 μl -Aliquots in PCR-Tubes eingefroren und nach dem Auftauen maximal 2

Wochen lang im Kühlschrank aufbewahrt. Eine einwöchige Aufbewahrung schon beschichteter Platten bei -20 °C, sowie für einen Tag im Kühlschrank war ebenfalls möglich.

Mittels chemometrischem Experimental Design unter Verwendung des Software-Paketes „Unscrambler“ wurde der Testablauf optimiert. Für das Screening Design wurde ein Fractional Factorial Design erstellt, um Effekte und Wechselwirkungen der einzelnen Testparameter zu erkennen. Für die abschließende Optimierung der mittels des Screening Designs identifizierten signifikanten Parameter wurde ein Box-Behnken Design ausgewählt. Über die so durchgeführte Optimierung ließen sich Arbeitsbedingungen ermitteln, die bei einem gewünscht niedrigen Verbrauch des aufwendig hergestellten Reagens gleichzeitig hohe Extinktionswerte für die abschließende Farbreaktion lieferten.

Das Testsystem wurde für verschiedene tierische Lebensmittel als Screening Test entwickelt. Bis auf Cefalonium, das eine zu geringe Bindungsaffinität aufwies, konnten alle in der EU relevanten β -Lactam-Antibiotika mittels des entwickelten Testsystems unterhalb der gesetzlichen Höchstmenge nachgewiesen werden.

Die bei direkt verwendeten Lebensmitteln zu beobachtenden Matrixinterferenzen ließen sich durch eine zehnfache Verdünnung von Roh- oder Konsummilch, Honig, Vollei, Eigelb und Tausaft des Muskelfleischs von Schwein und Pute mit Puffer eliminieren. Wurde Milch durch Zentrifugation entfettet, führte dies auch ohne Verdünnung zu einer Elimination des Matrixeffektes. Wenn es wie bei den genannten Matrices gelang, den Matrixeffekt auszuschalten, war eine direkte Auswertung von Probenresultaten über eine Pufferkalibrierung möglich. Die Matrixeffekte, die durch den Tausaft vom Muskelfleisch vom Rind oder durch Eiklar verursacht wurden, konnten durch eine zehnfache Verdünnung lediglich reduziert werden. Für die Analyse des Tausaftes aus dem Muskelfleisch vom Hirsch musste zur Reduktion der Matrixeffekte zusätzlich eine Membranfiltration vor der Verdünnung erfolgen. Proben, die β -Lactame enthielten, konnten in solchen Fällen nur dann als positiv identifiziert werden, wenn eine Matrixkalibrierung durchgeführt wurde.

Angelehnt an die Validierungsvorgaben der EU-Entscheidung 2002/657 wurde der entwickelte Mikrotiterplattentest für die Matrix Rohmilch und die β -Lactam-Antibiotika Benzylpenicillin, Ampicillin, Cefquinom und Cefoperazon erfolgreich hinsichtlich der Parameter Spezifität, Reproduzierbarkeit, Präzision und Genauigkeit überprüft und die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ und das Nachweisvermögen $CC\beta$ bestimmt.

Der Mikrotiterplattentest erwies sich auch für quantitative Analysen als geeignet, wenn – wie in Medikationsstudien zum Rückstandsverhalten von Tierarzneimitteln – der eingesetzte Wirkstoff bekannt war. Die Leistungsfähigkeit des Tests bezüglich dieser quantitativen Option wurde an 289 Milchproben überprüft, die jeweils eines der vier β -Lactame als authentischen Rückstand enthielt. Die Proben stammten aus Medikationsstudien die am BfEL in Kiel durchgeführt wurden und dort auch mittels HPLC und verschiedenen qualitativen Tests untersucht worden waren. Der nach den Untersuchungen vorgenommene Ergebnisvergleich zeigte eine sehr gute Übereinstimmung der quantitativen Daten. Bei der qualitativen Auswertung führte der entwickelte Mikrotiterplattentest weder zu falsch-negativen noch falsch-positiven Resultaten.

9. Arbeitsvorschriften

9.1 Expression und Aufreinigung des PBP 2x*

Zur Expression des Rezeptorproteins PBP 2x* stand ein *E. coli* BL21-Stamm zur Verfügung, der das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x*, das das PBP 2x*-GST-Fusionsprotein codiert, wobei sich die Glutathion-S-Transferase an dem Amino-Ende des PBP 2x* befindet, enthielt. Dieser Bakterienstamm wurde von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt.

Materialien und Geräte

Schüttelinkubator (Typ: Innova 4000, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA)

Schikanenkolben, 2-Liter (Roth, Karlsruhe)

Peristaltische Pumpe (Typ: 2232, LKB/Bromma, Schweden)

Glassäule (1 x 10 cm) mit Luer-Lock-Anschluss und Flussadapter (Sigma, Taufkirchen)

Dialysierschlauch ZelluTrans, MWCO: 12-14 kDa (Roth, Karlsruhe)

0,22 µm Spritzenfilter, PVDF, steril (Roth, Karlsruhe)

10 ml Einmalspritzen, steril (Roth, Karlsruhe)

Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R, VWR International, Darmstadt)

Zentrifuge Centrikon H-401 B (Rotor A 6.9; Kontron Instruments; Berthold Hermle KG, Gosheim)

Ultrazentrifuge L7-55 (Rotor 70 Ti; Beckman Instruments, Krefeld)

Autoklav: Varioklav Typ 500 V (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)

French Press (American Instrument Co. Inc., Silver Spring, Md.)

Reagenzien und Lösungen

Glutathion-Agarose (Sigma, Taufkirchen)

Reduziertes Glutathion (Fluka, Taufkirchen)

Prescission Protease (Amersham Biosciences, Freiburg)

Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) (Roche Applied Science, Mannheim)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma, Taufkirchen)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fluka, Taufkirchen)

Desoxyribonuclease (DNase) (Sigma, Taufkirchen)

Ribonuclease (RNase) (Fluka, Taufkirchen)

Tetracyclin (Sigma, Taufkirchen)

Reinstwasser (Reinstwasseranlage MilliQ Plus, Millipore, Eschborn)

E. coli BL21-Stammkultur zur Expression von PBP 2x* (durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Hakenbeck (Universität Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt, gelagert bei -80°C)

PBS Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,3)

Protease Puffer 1 (0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Dithiothreitol; pH 7,0)

Protease Puffer 2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol; pH 7,0)

Nährmedium

2xTY-Medium mit 15 mg/l Tetracyclin:

| | |
|-------------------------------|------|
| Trypton (Roth, Karlsruhe) | 16 g |
| Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe) | 10 g |
| NaCl (Fluka, Taufkirchen) | 5 g |
| Reinstwasser | 1 l |

Das Nährmedium wurde für 16 Minuten bei 121°C und 1,2 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurden 10 ml einer sterilfiltrierten Tetracyclin-Lösung (1,5 mg/ml in Methanol/Wasser (1/9; v/v)) dem Nährmedium zugegeben.

Expression

Aus einer Stammkultur von *E. coli* BL21 (pGEX-tet-PBP 2x*) wurde mittels einer Impföse das 2xTY-Medium (versetzt mit 15 mg/l Tetracyclin) angeimpft und bei 37°C und 250 rpm in einem 2l Schikanekolben dieser *E. coli* kultiviert, wobei 10 ml einer Übernachtskultur in 500 ml frischem 2xTY-Medium mit 15 mg/l Tetracyclin verdünnt und bis zum Beginn der Exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von ca. 0,6-0,8) angezogen wurde. Durch Zugabe einer 100 mM wässrigen IPTG-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Proteinexpression induziert und die Zellen für weitere drei Stunden inkubiert. Die Sedimentation der Zellen erfolgte dann durch Zentrifugation (Centrikon H-401 B) bei 4200 x g und 4°C für 20 Minuten. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend einmal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und erneut durch Zentrifugation (4200 x g, 4°C, 20 Minuten) gesammelt. Die Zellen wurden bis zur weiteren Aufarbeitung am nächsten Tag bei -20°C gelagert.

Das tiefgekühlte Pellet wurde in 20 ml eiskaltem PBS-Puffer suspendiert und mit Stammlösungen bis zu einer Endmolarität von 2 mM PMSF, 5 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl₂ sowie einigen Kristallen DNase und RNase versetzt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch drei French Press-Zyklen bei 18.000 psi. Nach Zentrifugation (Megafuge 1.0) bei 6238 x g für 10 Minuten bei 4 °C erfolgte mit dem Überstand ein weiterer Zentrifugationsschritt (Ultrazentrifuge) für 15 Minuten bei 4°C und 25.000 x g. Aus dem daraus resultierenden Überstand (Rohextrakt) wurde das GST-PBP 2x*-Fusionsprotein mittels Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Aufreinigung

Die Glutathion-Affinitätschromatographie wurde bei Raumtemperatur in einer Glassäule mit 5 ml Glutathion-Agarose und einer peristaltischen Pumpe durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde gewaschen, indem es mit zehn Säulenvolumina Reinstwasser und anschließend mit zehn Säulenvolumina PBS-Puffer (versetzt mit 10 mM MgCl₂ und 5 mM DTT) bei einem Fluss von 0,4 ml/min konditioniert wurde. Anschließend wurde der gewonnene Rohextrakt bei gleichem

Fluss mehrmals über die Säule gegeben, indem dieser für eine Stunde im Kreis gefahren wurde. Zur Entfernung der anderen bakteriellen Proteine wurde die Säule im Anschluss daran mit zehn Säulenvolumina PBS-Puffer bei einem Fluss von 1 ml/min gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 10 mM reduziertem Glutathion in 50 mM TRIS-HCl pH 8,0. Dabei wurden die ersten 500 µl verworfen. Das restliche Eluat wurde in 4 Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen. Es wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford [195] mit BSA als Standardprotein durchgeführt, um entscheiden zu können, welche der Fraktionen mit der PreScission Protease versetzt werden soll. Die proteinreichste Fraktion wurde anschließend mit der Protease versetzt. Dazu wurden 1 µl PreScission Protease zu je 100 µg nach Bradford bestimmtem Protein gegeben. Zusätzlich erfolgte noch eine Zugabe von 550 µl Protease Puffer 1. Diese Lösung wurde für 24 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Verdau, nun bestehend aus PreScission Protease, Glutathion-S-Transferase-tag und freiem PBP 2x*, gegen je 5 l Protease-Puffer 2 für 24 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank dialysiert, wobei der Protease-Puffer zwischendurch zweimal ausgetauscht wurde.

Die Entfernung des GST-tag und der PreScission Protease (ebenfalls ein GST-Fusionsprotein) erfolgte mittels Glutathion-Agarose im Batch-Verfahren. Dazu wurde 1 ml Glutathion-Agarose mit der erhaltenen Lösung aus der Dialyse versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler umgeschwenkt. Das PBP 2x* befand sich in der nicht adsorbierten Fraktion. Der Überstand wurde abgenommen, auf einen Gehalt von 10 % Glycerin gebracht und bei -20 °C gelagert. Die Expression und Aufreinigung des PBP, sowie die Stabilität unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen wurde mittels der SDS-PAGE verfolgt (siehe Abschnitt 9.3).

9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteingehalt mit der Methode nach Bradford bestimmt [195]. Das Detektionsprinzip dieses Tests ist die unspezifische Anlagerung des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G 250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen, was eine Veränderung im Absorptionsverhalten des Farbstoffes bewirkt.

Geräte

Mikrotiterplatten Reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Reinstwasseranlage (MilliQ Plus; Millipore, Eschborn)

Materialien

1,5 ml Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe)

96-well Mikrotiterplatten, Standard (Nunc, Wiesbaden)

50 ml Reaktionsröhrchen (Roth, Karlsruhe)

Reagenzien und Lösungen

Roti-Nanoquant = Bradford-Reagenz (Roth, Karlsruhe)

→ gebrauchsfertige Lösung: 5-fach verdünnt

Bovines Serumalbumin BSA (Sigma, Taufkirchen)

Reinstwasser (Millipore Aufbereitungsanlage: MilliQ Plus)

Die Proteinbestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. 50 µl der Standard-Verdünnungsreihe (Kalibrierung mit BSA als Standardprotein) bzw. der Probenverdünnung aus der PBP 2x*-Expression und Reinigung wurden als Dreifachbestimmung in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl des verdünnten Bradford-Reagenz zu den vorgelegten Standards und Proben hinzu pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenreader bei 595 nm. Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel wurden anhand der über die BSA Verdünnungsreihe (BSA-Konzentrationen im Bereich von 0 – 100 µg/ml) erhaltenen Extinktionen die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Lämmli [196] können Proteine mittels einer vertikalen Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Das Gelmaterial besteht dabei aus Polyacrylamid, das mittels Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) hergestellt wird. Bei einer radikalischen Reaktion, die durch APS gestartet wird, wird dabei ein vernetztes Polymer gebildet. Die Prozentzahl, die ein Gel beschreibt (z. B. 10 %iges Trenngel) gibt dabei den Vernetzungsgrad des Gels, der durch die Acrylamidkonzentration festgelegt werden kann, an. Die Trennung bei der SDS-PAGE korreliert i.a. mit dem Molekulargewicht. Zu den Proteinlösungen wird Natriumdodecylsulfat (SDS = sodium dodecyl sulfate) gegeben und reduzierende Bedingungen (Erhitzung, Zugabe von Mercaptoethanol) eingestellt. Dabei werden die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zerstört, so dass sich die Proteine auffalten und lang gestreckte Protein-Ketten entstehen, denen SDS mit dem negativ geladenen Sulfatrest nach außen aufgelagert ist. Durch die reduzierenden Arbeitsbedingungen werden zudem die Disulfidbrücken der Proteine gespalten. Dies bedingt bei allen Proteinen das gleiche Masse-/Ladungs-Verhältnis, so dass die Proteinwanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Eigenladung der Proteine abhängt, sondern nur noch von den sterischen Verhältnissen und somit in Korrelation zur Molekularen Masse.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer diskontinuierlichen SDS-PAGE gearbeitet, um schärfere Banden zu erhalten. Bei dieser Form der SDS-PAGE überschichtet ein großporiges (5 %iges) Sammelgel ein kleinporiges (10 %iges) Trenngel. Das Sammelgel weist eine größere Porenweite, eine geringere Salzkonzentration sowie einen niedrigeren pH-Wert auf, als das Trenngel (siehe 9.4.1). Der Elektrodenpuffer besteht aus TRIS-Glycin und weist den gleichen pH-Wert wie das Trenngel auf. Im Sammelgel liegt das Glycin neutral (Zwitterion = Folgeion) vor und wandert aufgrund dessen viel langsamer als das negativ geladene Chlorid-Ion (Leitton) im Sammelgel. Zwischen diesen beiden bildet sich eine Potentialdifferenz aus, wobei die Proteine zwischen diesen beiden Ionen wandern und somit in engen Banden im Sammelgel fokussiert werden. Beim Einwandern in das Trenngel ändern sich der pH-Wert und die Porengröße. Das Glycin liegt nun negativ geladen vor und wandert an der Front,

wodurch die Potentialdifferenz aufgehoben wird und die Proteine nach ihrer Molekülgestalt bzw. Masse aufgetrennt werden.

Geräte

Gelgießapparatur und Elektrophoresekammer sowie zugehörige Glasplatten und Elektrophoresekamm 0,75 mm (Mini Protan II, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Schüttler (Typ GFL 3011, VWR International, Darmstadt)

Dokumentationsgerät (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Zentrifuge für 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Heraeus Biofuge 15 R, VWR International, Darmstadt)

Reinstwasseranlage (MilliQ Plus; Millipore, Eschborn)

Materialien

1,5 ml Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe)

Kolbenhubpipetten, variabel (0,5 – 10 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl) (Eppendorf AG, Hamburg)

Einweg-Plastikpipetten (Roth, Karlsruhe)

15 ml Reaktionsröhrchen (Roth, Karlsruhe)

Reagenzien und Lösungen

30:0,8 Acrylamid:Bis-Acrylamid (Sigma, Taufkirchen)

TRIS (Sigma, Taufkirchen)

SDS (Sigma, Taufkirchen)

TEMED (Sigma, Taufkirchen)

Ammoniumpersulfat (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Reinstwasser (Millipore Aufbereitungsanlage: MilliQ Plus)

Glycin (Roth, Karlsruhe)

Bromphenolblau (Sigma, Taufkirchen)

Mercaptoethanol (Sigma, Taufkirchen)

Glycerin (Roth, Karlsruhe)

Proteinstandard (High Molecular Range, Sigma, Taufkirchen)

RotiBlue[®]-Färbelösung (Roth, Karlsruhe)

Methanol (Roth, Karlsruhe)

Elektrodenpuffer (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin; 1 g SDS auf 1 Liter Reinstwasser)

SDS Probenpuffer (Tris/HCl, pH 6,8; 1 % SDS; 10% Glycerin; 50 % Mercaptoethanol und eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau)

9.3.1 Herstellung des Polyacrylamidgels (Minigel)

Zwei Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt und in die Gelgießapparatur (Mini Protan II; Bio Rad) eingespannt. Mittels einer Einweg-Plastikpipette wurde dann das noch flüssige Trenngel zwischen die Platten gegossen. Zur Begradigung der Oberfläche wurde das Trenngel mit Reinstwasser überschichtet. Nach Beendigung des Polymerisations-Prozesses wurde das Wasser abgegossen und mittels eines Filterpapiers der Raum über dem Trenngel getrocknet. Anschließend wurde das noch flüssige Sammelgel gegossen und ein Elektrophoresekamm (0,75 mm) eingesetzt, durch den die Taschen gebildet wurden. Nach Abschluss der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel bis zum nächsten Tag bei 4 °C gelagert. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde dieses mit nassen Papiertüchern abgedeckt und in einer Plastiktüte verwahrt. Am anderen Morgen wurden die Gele dann in eine vertikale Elektrophoresekammer (Mini Protan II; Bio Rad) eingesetzt und diese mit Elektrodenpuffer gefüllt.

| | Trenngel (10 %ig) | Sammelgel (5 %ig) |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 30 : 0,8 Acrylamid : Bis-Acrylamid | 3,35 ml | 0,85 ml |
| 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 | - | 1,25 ml |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 | 2,5 ml | - |
| bidest. Wasser | 4,05 ml | 2,85 ml |
| 10 % SDS (in Wasser) | 100 µl | 50 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl |
| 20 % APS (in Wasser) | 50 µl | 50 µl |

Tabelle 22: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels (Menge ausreichend für 2 Minigele)

9.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer so verdünnt, dass pro Tasche eine Absolutmenge von 1 µg Protein mit 10 µl aufgetragen werden konnte. Die verdünnten Proben wurden für 5 Minuten in einem 100 °C heißen Heizblock inkubiert und für 2 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. 10 µl der so vorbereiteten Proben wurden dann mittels einer Eppendorfpipette in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurden 3 µl des Proteinstandards aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen folgender Stromstärken:

Beim Sammelgel wurde die Stromstärke auf 15 mA eingestellt (resultierende Spannung: ~50 V). Bei Übergang der Bromphenolblaulinie in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht (resultierende Spannung: 110 – 165 V). Die elektrophoretische Trennung wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblaulinie aus dem Trenngel herausgelaufen war. Das Gel wurde aus der Kammer entfernt, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in die Färbelösung gelegt.

9.3.3 Gelfärbung

Die Färbung wurde mit der Roti-Blue[®] Färbelösung durchgeführt. Dabei wurde die Gebrauchslösung aus der 5-fach konzentrierten, kolloidalen Stammlösung wie folgt hergestellt: 20 ml der Stammlösung wurden mit 60 ml Reinstwasser und 20 ml Methanol vermischt. Die Gele wurden dann über Nacht auf einem Schüttler in der Färbelösung belassen. Zur Entfärbung der unspezifischen Anfärbungen wurden die Gele am anderen Morgen mit einer wässrigen Methanollösung (25 %ig) entfärbt. Diese Lösung wurde innerhalb von 2 Stunden drei mal gewechselt. Beim Wechsel wurden zudem die Gele mit Reinstwasser abgewaschen. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation mittels des Gel Doc 2000 (Bio Rad) photographiert.

9.4 DIG-AMPI-Synthese

Materialien und Geräte

Vortex-Mischer (VWR International, Darmstadt)

HPLC-Anlage: Merck Hitachi LaChrom-System (VWR International, Darmstadt)

- Pumpe Model L-7100
- Autosampler Model L-7250
- UV/VIS-Detektor Model L-7420
- Fluoreszenzdetektor Model L-7485
- Integrator Model D-7500

Reagenzien

Ammoniumacetat (Fluka, Taufkirchen)

Reinstwasser (MilliQ Plus, Millipore, Eschborn)

Acetonitril HPLC-grade (Roth, Karlsruhe)

Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS) (Roche Applied Science, Mannheim)

Ampicillin (Fluka, Taufkirchen)

Dimethylformamid (Fluka, Taufkirchen)

Bocillin FL (Mobitec, Göttingen)

di-Natriumhydrogenphosphat (Sigma, Taufkirchen)

Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka, Taufkirchen)

chromatographisches System zur DIG-AMPI-Synthese

| | |
|------------------------|---|
| Säule: | Supelcosil LC308 RP8 250 x 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å |
| Eluent: | Eluent A: 25 mM Ammoniumacetat Eluent B: 25 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (70/30; v/v) A/B (15/85; v/v) |
| Injektionsvolumen: | 50 μ l |
| Fluss: | 1 ml/min |
| Detektionswellenlänge: | 230 nm |

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Cacciatore et al. [4], die Reagenzienmengen zur Synthese jedoch verdoppelt. 10 mg DIG-NHS wurden in 240 μ l Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Ampicillin-Lösung (20 mg in 240 μ l Reinstwasser) gegeben und dieser Ansatz im Gegensatz zu der Vorschrift, wie sie bei Cacciatore et al. beschrieben wurde, nicht nur 4 Stunden, sondern über Nacht auf dem Vortex-Mischer geschüttelt. Am anderen Morgen wurde 1 ml Reinstwasser hinzugegeben und das so synthetisierte DIG-AMPI mittels HPLC aufgereinigt und fraktioniert. Die Identifikation des DIG-AMPI-Peaks erfolgte zum einen durch Zugabe von β -Lactamase und zum anderen durch PBP 2x*-Zugabe. In beiden Fällen wurde die Fläche des DIG-AMPI-Peaks kleiner. Die gesammelten Fraktionen wurden abschließend vereint und das Acetonitril unter Stickstoff abgedampft. Die restliche Lösung wurde gefriergetrocknet und das nun aufgereinigte DIG-AMPI in 1 ml PBS Puffer aufgenommen. Von dieser Stammlösung wurden 50 μ l zur Konzentrationsbestimmung abgenommen und die restliche Lösung zu 50 μ l aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

chromatographisches System zur DIG-AMPI-Konzentrationsbestimmung

| | |
|------------------------|---|
| Säule: | Biosep SEC-S 2000 300 x 7,8 mm |
| Eluent: | Eluent A: 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6,8 Eluent B: Acetonitril 0 – 10 Minuten 100 % A 10 – 12 Minuten 50 % A 12 – 30 Minuten 50 % A 30 – 32 Minuten 100 % A 32 – 45 Minuten 100 % A |
| Injektionsvolumen: | 50 μ l |
| Fluss: | 1 ml/min |
| Detektionswellenlänge: | λ_{Ex} 480 nm, λ_{Em} 520 nm |

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie bei Cacciatore [141] beschrieben. In einem nicht-kompetitiven Inhibierungsassay wurden je 90 µl verschiedener DIG-AMPI- oder Ampicillin-Verdünnungen mit 10 µl einer PBP 2x*-Lösung (Stammlösung zuvor 1:5 verdünnt) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Bocillin FL und es wurde die restliche Penicillin-bindende Aktivität gefiltrationschromatographisch bestimmt.

Durch Vergleich der DIG-AMPI-Werte mit den Ampicillin-Werten und Extrapolation über die Kalibrierung mit Ampicillin wurde der DIG-AMPI-Gehalt ermittelt.

9.5 Analysen mittels Mikrotiterplattentest

Geräte

Mikrotiterplatten-Washer (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall)

Schüttler für Mikrotiterplatten (Typ SM 25, Edmund Bühler GmbH, Hechingen)

Temperiereinheit für Mikrotiterplatten (eigene Herstellung: Aluminiumboxen, die von temperiertem Wasser durchströmt werden) → siehe Kapitel 6.3

Umlaufkühler (Typ MGW Lauda RM 6, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co.KG, Königshofen)

→ kombiniert als Mikroplatten-Thermoschüttler PHMP (VWR International, Darmstadt) erhältlich

Mikrotiterplatten Reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Digitales pH-Meter (Typ 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.KG, Berlin)

pH-Elektrode (Typ Z-451, Schott Instruments GmbH, Mainz)

Grobwaage (Sartorius BP 1200, VWR International, Darmstadt)

Schüttelbad (Julabo SW1, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)

Kühl-Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R, VWR International, Darmstadt)

Tischzentrifuge (Hermle Z 200 A, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Materialien

96-well Mikrotiterplatten, MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden)

96-well Mikrotiterplatten, PolySorp (Nunc, Wiesbaden)

Deckel für Nunc-Mikrotiterplatten mit Kondensationsring (Nunc, Wiesbaden)

Mehrkanalpipette 30 – 300 µl (Eppendorf AG, Hamburg)

Multipette Plus (Eppendorf AG, Hamburg)

Kolbenhubpipetten, variabel (0,5 – 10 µl; 20 – 200 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl)
(Eppendorf AG, Hamburg)

Messkolben (5 ml, 10 ml, 20 ml) (VWR International, Darmstadt)

Bechergläser (25 ml, 50 ml, 100 ml) (VWR International, Darmstadt)

Vollpipetten (1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml) (VWR International, Darmstadt)

Enzymtestpipetten (0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml) (Brand GmbH & Co.KG, Wertheim)

1,5 ml Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe)

15 ml Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe)

50 ml Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe)

Reagenzien und Lösungen

Stammlösung Penicillin Bindeprotein PBP 2x* (eigene Herstellung, siehe 9.1)

Stammlösung Digoxigenin-markiertes Ampicillin (eigene Herstellung, siehe 9.4)

Anti-Digoxigenin-POD, Fab Fragmente (Roche Applied Science, Mannheim)

Amoxicillin (Fluka, Taufkirchen)

Ampicillin (Fluka, Taufkirchen)

Benzylpenicillin (Fluka, Taufkirchen)

Cloxacillin (Fluka, Taufkirchen)

Dicloxacillin (Fluka, Taufkirchen)

Nafcillin (Sigma, Taufkirchen)

Oxacillin (Sigma, Taufkirchen)

Phenoxymethylpenicillin (Sigma, Taufkirchen)

Cefacetril (Novartis, Nürnberg)

Cefalexin (Sigma, Taufkirchen)

Cefalonium (LCG Promochem, Wesel)

Cefapirin (Intervet, Schwabenheim)

Desacetylcefapirin (Intervet, Schwabenheim)

Cefazolin (Sigma, Taufkirchen)

Cefoperazon (Sigma, Taufkirchen)

Cefquinom (Intervet, Schwabenheim)

Ceftiofur (Fluka, Taufkirchen)

Colistin (Sigma, Taufkirchen)

Hydrolysierte Penicilline (eigene Herstellung: 10 mg des jeweiligen Penicillins wurden in 9,8 ml Methanol und 0,2 ml 1 M KOH gelöst. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank)

NaCl (Roth, Karlsruhe)

NaHCO₃ (Roth, Karlsruhe)

Na₂HPO₄ (Sigma, Taufkirchen)

KH₂PO₄ (Fluka, Taufkirchen)

Tween 20 (Sigma, Taufkirchen)

Casein (Sigma, Taufkirchen)

KOH (Roth, Karlsruhe)

Citronensäure-Monohydrat (Roth, Karlsruhe)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma, Taufkirchen)

Methanol (Roth, Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid 30 %ig (Roth, Karlsruhe)
Salzsäure 37%ig (Roth, Karlsruhe)
Aceton (Roth, Karlsruhe)
wasserfreies Toluol (Roth, Karlsruhe)
wasserfreies Methanol (Roth, Karlsruhe)
wasserfreies Aceton (Roth, Karlsruhe)
Dimethyldichlorsilan (Sigma, Taufkirchen)

Behandlung von Glasgeräten

Penicilline werden leicht an der Oberfläche von Glas adsorbiert. Aus diesem Grund wurden für die meisten Arbeiten (vor allem die qualitativen und semi-quantitativen Arbeiten) Polypropylen-Produkte verwendet. Zur Durchführung der verdeckten Kontrollanalysen (Kap. 6.6.6) und zum Ansetzen der Stammlösungen wurden jedoch Glasgefäße verwendet. Zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten wurden alle verwendeten Pipetten, Messkolben und Bechergläser mit einer Dimethyldichlorsilanlösung in wasserfreiem Toluol (10 ml/100 ml) deaktiviert [145]. Diese Lösung wurde für 30 Minuten in den Glasgefäßen gelassen. Nach den 30 Minuten Einwirkzeit wurden die Gefäße mit wasserfreiem Toluol und anschließend mit wasserfreiem Methanol gespült. Zur Trocknung wurden die Glasgefäße dann in einen 70 °C heißen Trockenschrank gestellt. Benutzte Glasgefäße wurden von Hand mit einer Detergensenlösung gereinigt und mit Leitungswasser, destilliertem Wasser und wasserfreiem Aceton nachgespült und im Trockenschrank (70 °C) getrocknet. Die Desaktivierungsprozedur wurde wiederholt, nachdem die Glasgefäße zehnmal verwendet worden sind.

Für den Testablauf des Mikrotiterplattentests werden verschiedene Puffer benötigt. Zum Ansetzen aller Lösungen wird Reinstwasser (deionisiertes Wasser, das zusätzlich mittels einer MilliQ-Anlage inklusive Filtration durch einen 0,2 µm Filter gereinigt wurde) verwendet.

| Puffer / Lösung | Komponente | Menge |
|--|----------------------------------|--------------|
| Beschichtungspuffer (Bicarbonatpuffer pH 9,5) | Na ₂ CO ₃ | 1,59 g |
| | NaHCO ₃ | 2,93 g |
| | Reinstwasser | 1000 ml |
| 0,01 mol/l PBS Puffer; pH 7,2 | NaCl | 6,79 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,47 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,43 g |
| | Reinstwasser | 1000 ml |
| Waschlösung | NaCl | 8,55 g |
| | Tween 20 | 0,25 ml |
| | Reinstwasser | 1000 ml |
| Blockpuffer | Casein | 4 g |
| | 0,01 mol/l PBS Puffer | 200 ml |
| Verdünnungspuffer | Casein | 2 g |
| | 0,01 mol/l PBS Puffer | 200 ml |
| 0,21 mol/l Citratpuffer pH 3,9 - 4,0 | Citronensäure * H ₂ O | 8,81 g |
| | 1 mol/l KOH | 40 ml |
| | Reinstwasser | 160 ml |
| | Wasserstoffperoxid | 65 µl |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung | Tetramethylbenzidin | 50,4 g |
| | Aceton | 1 ml |
| | Methanol | 9 ml |
| Substrat-/Chromogenlösung (unmittelbar vor Gebrauch herstellen) | 0,21 mol/l Citratpuffer | 20 ml |
| | Tetramethylbenzidin-Lösung | 1 ml |
| Stoppreagenz (1 mol/l HCl) | konz. HCl | 8 ml |
| | Reinstwasser | 92 ml |

Tabelle 23: Benötigte Reagenzien für die Durchführung des Mikrotiterplatten-Rezeptortests

9.5.1 Plattenbeschichtung

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde die PBP 2x*-Stammlösung in Beschichtungspuffer so verdünnt, dass mit je 100 µl eine Absolutmenge von 150 ng PBP 2x* mittels einer Multipette in die Kavitäten pipettiert wurden. Die Platten wurden mittels eines Deckels verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

9.5.2 Testablauf

Am Folgetag wurden die Platten mit PBS Puffer gewaschen und im Anschluss für 30 Minuten mit 2 %iger-Casein-Lösung geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach weiteren Waschschrritten (3-mal mit PBS Puffer) wurden 100 µl-Aliquote der Probe bzw. der Kalibrierstandards in Triplikaten in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl DIG-AMPI (Stammlösung 1:60.000 verdünnt) pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Platten jeweils zweimal mit Waschlösung und PBS Puffer gewaschen. 100 µl anti-Digoxigenin-F_{ab} Fragmente (Stammlösung 1:1.500 verdünnt) konjugiert mit Meerrettichperoxidase wurden hinzugegeben, um die PBP/DIG-AMPI-Komplexe zu markieren. Nach 45 Minuten wurden die Platten erneut mit je zweimal Waschlösung und PBS gewaschen. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Substrat-/Chromogen-Lösung gestartet. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M HCl gestoppt. Die Extinktionen wurden mittels eines Mikrotiterplatten-Readers bei 450 nm photometrisch bestimmt.

Beim praktischen Arbeiten im Labor wurde nach folgendem Fließschema (Abbildung 77) vorgegangen:

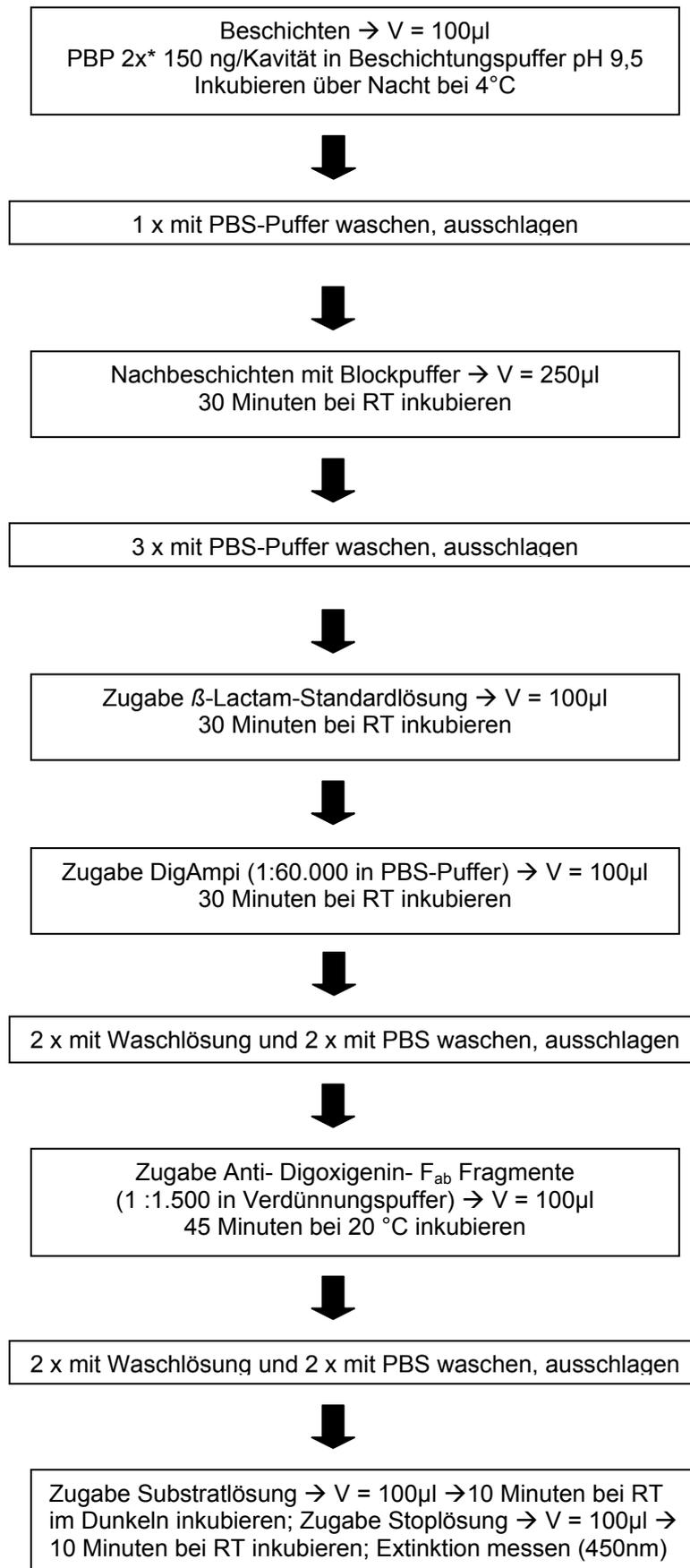


Abbildung 77: Darstellung des optimierten und im Labor verwendeten Fließschemas zur Durchführung des entwickelten Mikrotiterplattenassays

9.5.3 Schachbretttitration

Zur Bestimmung der optimalen Beschichtungsmenge mit PBP 2x* und zur Ermittlung der geeigneten Verdünnungen von DIG-AMPI und der anti-DIG-F_{ab}-Fragmente wurden diese drei Komponenten durch Schachbrett-Titration nach Crowther [133] bestimmt. Mittels der Schachbrett-Titration können jedoch maximal zwei Reagenzien gegeneinander titriert werden. In Abbildung 78 wird die Vorgehensweise der Schachbrett-Titration dargestellt.

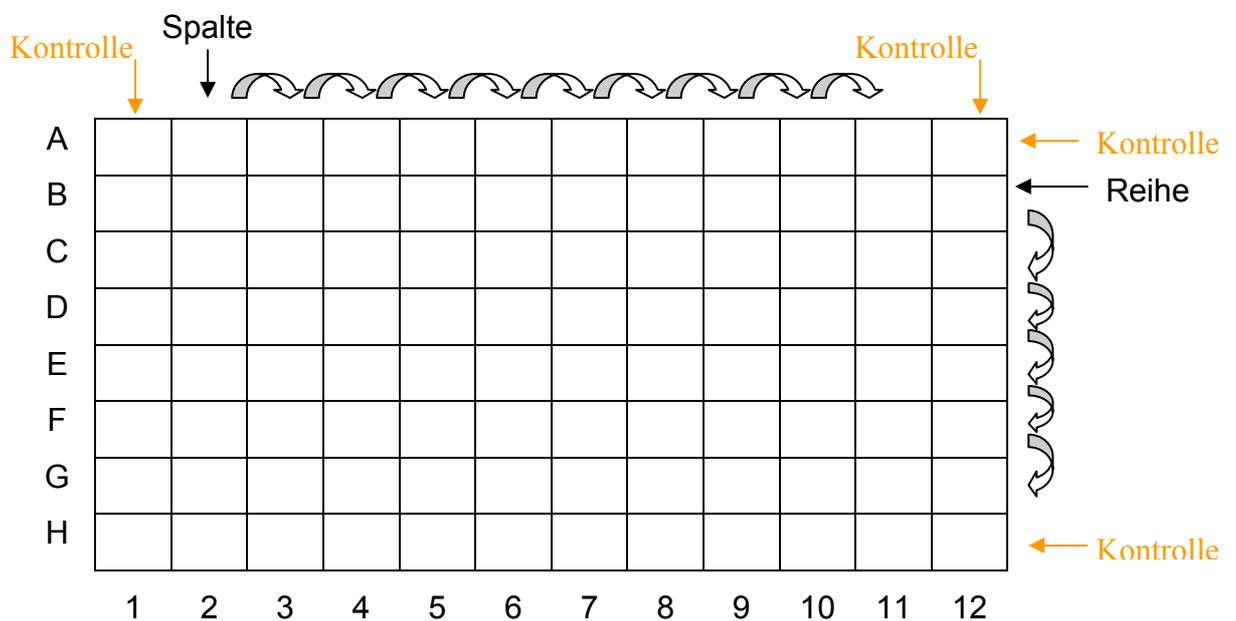


Abbildung 78: Schachbrett-Titration (schematische Darstellung des Ablaufs)

Die Ränder der Platte wurden für die Kontrollen verwendet, um Randeffekte bei der Bestimmung der optimalen Bedingungen auszuschließen. Im ersten Schritt wird die Beschichtungsmenge von B nach G in serieller 1:3 Verdünnung variiert (A: 1.000 ng/Kavität; B: 333 ng/Kavität; C: 111 ng/Kavität; etc.). Nach der Beschichtung wird wie in 9.5.2 beschrieben der Test weiter durchgeführt. Im zweiten Schritt wird die Verdünnungsstufe von DIG-AMPI variiert. Hierbei erfolgt die serielle 1:3 Verdünnung von Spalte 2 bis 6 (Spalte 2: Stammlösung 1:1.500 verdünnt; Spalte 3: 1:4.500; etc.). Die Platte wurde zudem zweigeteilt, um direkt die Sensitivität des Testsystems bei Anwesenheit von 2 µg/kg Ampicillin und bei bestimmten

Parameterkombinationen zu überprüfen. Eine Plattenbelegung ist in Abbildung 79 exemplarisch dargestellt.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | 1.500 1000 | 4.500 1000 | 13.500 1000 | 40.500 1000 | 121.500 1000 | 1.500 1000 | 4.500 1000 | 13.500 1000 | 40.500 1000 | 121.500 1000 | |
| C | | 1.500 333 | 4.500 333 | 13.500 333 | 40.500 333 | 121.500 333 | 1.500 333 | 4.500 333 | 13.500 333 | 40.500 333 | 121.500 333 | |
| D | | 1.500 111 | 4.500 111 | 13.500 111 | 40.500 111 | 121.500 111 | 1.500 111 | 4.500 111 | 13.500 111 | 40.500 111 | 121.500 111 | |
| E | | 1.500 37 | 4.500 37 | 13.500 37 | 40.500 37 | 121.500 37 | 1.500 37 | 4.500 37 | 13.500 37 | 40.500 37 | 121.500 37 | |
| F | | 1.500 12 | 4.500 12 | 13.500 12 | 40.500 12 | 121.500 12 | 1.500 12 | 4.500 12 | 13.500 12 | 40.500 12 | 121.500 12 | |
| G | | 1.500 4 | 4.500 4 | 13.500 4 | 40.500 4 | 121.500 4 | 1.500 4 | 4.500 4 | 13.500 4 | 40.500 4 | 121.500 4 | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

Abbildung 79: Schachbrett-Titration für die Bestimmung der optimalen PBP-Beschichtungs- und der DIG-AMPI-Verdünnungsstufe. Blaues Kästchen: in alle Kavitäten wurde statt β -Lactam-Standard PBS-Puffer pipettiert; rotes Kästchen: allen Feldern wurde Ampicillin zugegeben; schwarze Zahlen: Verdünnung der DIG-AMPI-Stammlösung 1: x; grüne Zahlen: PBP-Beschichtungs- menge in ng/Kavität

In den Reihen A und H sowie den Spalten 1 und 12 wurden mehrere Kontrollen durchgeführt, um unspezifische Reaktionen festzustellen.

1. Kontrolle: Kavität ohne DIG-AMPI
2. Kontrolle: Kavität ohne PBP
3. Kontrolle: Kavität ohne anti-DIG-F_{ab}-Fragmente

Anschließend folgte eine zweite Schachbretttitration, bei der die PBP-Beschichtungs- menge (serielle 1:3 Verdünnung im Bereich von 4 – 1000 ng) gegen die unter- schiedlichen anti-DIG-F_{ab}-Fragment-Verdünnungsstufen (1:1.000; 1:1.500; 1:2.000; 1:2.500 und 1:3.000) gegeneinander titriert wurden.

9.5.4 Dotierung der Lebensmittelproben

Stammlösungen der β -Lactam Antibiotika wurden in PBS-Puffer angesetzt und in diesem verdünnt, um Arbeitslösungen der entsprechenden Konzentrationen zu erhalten. Diese Arbeitslösungen wurden zur Probandotierung oder Erstellung von Kalibriergeraden verwendet und wurden jeden Tag frisch angesetzt. Die

Probendotierung erfolgte, indem eine bekannte Menge β -Lactam zu vorher auf Rückstandsfreiheit untersuchten Blank-Proben gegeben wurde. Zur Erhaltung der Probeneigenschaften wurde nur eine geringe Menge der Standardlösung zu der jeweiligen Probenmatrix zugegeben. Der Zusatz betrug $\leq 1\%$ der Probenmenge. Nach der Dotierung wurden die Proben auf einen automatischen Schüttler gestellt und dort 15 Minuten lang durchmischt, um eine adäquate Durchmischung der β -Lactame und der Probenmatrix zu gewährleisten.

9.5.5 Analyse von Milch

Alle Milchproben, mit Ausnahme der Proben die zur Untersuchung des Matrixeinflusses eingesetzt worden sind, wurden vor der Analyse mittels Zentrifugation (2400 x g, 4 °C, 15 min) entfettet. Die Zentrifugation der Konsummilchproben erfolgte aufgrund der vorausgegangenen Homogenisierung bei höheren g-Zahlen (4332 x g, 4 °C, 15 min).

9.5.6 Analyse von Muskelfleisch

Für die Bestimmung des Gehaltes an β -Lactamen in Muskelfleisch wurde der Tausaft von verschiedenen Fleischarten gewonnen. Dazu wurde das frische Fleisch bei -20 °C eingefroren und nach zwei Wochen Lagerzeit bei Raumtemperatur aufgetaut. Dabei war es für eine hinreichende Tausaftausbeute wichtig, dass die Probe vor dem Auftauen vollständig durchgefroren war. Der dabei ablaufende Tausaft wurde für die Untersuchung des Matrixeinflusses zentrifugiert (4260 x g, 5 min, RT) und direkt oder nach Verdünnung zur Analyse eingesetzt. Dazu wurde mit dem Tausaft eine Kalibrierkurve mit Ampicillin erstellt, die mit den Ergebnissen einer Kalibrierkurve in PBS Puffer (auf der gleichen Platte) verglichen wurde. Waren die Matrixeffekte zu stark, wurde der Tausaft in unterschiedlichen Stufen verdünnt bzw. membranfiltriert (Hirsch), um die Effekte zu reduzieren bzw. eliminieren.

9.5.7 Analyse von Ei

Zur Untersuchung der Matrixeinflüsse der Matrix Ei wurden die Ei-proben wie folgt behandelt. Zur Untersuchung von Eiklar, Eigelb und Vollei wurde ein einziges Ei aufgeschlagen, in Dotter und Eiklar getrennt und die einzelnen Gewichte bestimmt.

Anschließend wurden Dotter und Eiklar einzeln analysiert. Zur Bestimmung des Matrixeffekts von Vollei wurden Teile des zuvor getrennten Eiklar und Eigelb genommen und in vorab bestimmtem Verhältnis wieder vereint. So wurde sichergestellt, dass Matrixeinflüsse, die eventuell aus unterschiedlichen Fütterungs-, Haltungsbedingungen oder Rassen resultieren, sich nicht auf das Ergebnis auswirken und ausschließlich der Matrixeinfluss der drei Matrices untersucht wurde. Die ausschließliche Untersuchung von Vollei erfolgte durch das Aufschlagen der Eier, verquirlen und anschließender Verdünnung mit PBS Puffer. Die Verdünnung von 1:1 wurde aufgrund der hohen Viskosität der Matrix vorgenommen, um ein exaktes Pipettieren gewährleisten zu können.

9.5.8 Analyse von Honig

Der Honig wurde eingewogen und 1:1 mit PBS Puffer verdünnt, um, wie beim Ei, die Viskosität zu erniedrigen und ein exaktes Pipettieren zu gewährleisten.

9.5.9 Aufarbeitung der lyophilisierten Rohmilchproben

Gesunde und kranke deutsche Milchkühe der Rasse Holstein, schwarz-weiße, wurden 2003 im Rahmen einer Medikationsstudie am BfEL in Kiel mit unterschiedlichen Antibiotika behandelt und in gewissen Zeitabständen gemolken. Die so erhaltenen Milchproben wurden für 60 Stunden bei 6 °C und für drei weitere Wochen bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Milchproben zur weiteren Aufbewahrung lyophilisiert und bei 6 °C gelagert. Die Proben wurden per HPLC und verschiedenster Schnelltestsyste me am BfEL in Kiel untersucht [191-193]. Unter Kühlung wurden diese Proben dann 2005 aus Kiel nach Wuppertal geschickt, wo die Proben durch Zugabe von zweifach destilliertem Wasser 2006 rekonstituiert worden sind. Dies geschah, indem die Proben nach Wasserzugabe durchmischt wurden und dann für 5 Minuten in einem 45 °C warmen Wasserbad erwärmt wurden. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei ein Teil des Fettes schon aufrahmte und anschließend zur vollständigen Entfettung zentrifugiert (2.400 x g, 4 °C, 15 min). Danach wurden die Proben direkt mittels des Mikrotiterplatten-Testsystems analysiert.

9.6 Analysen mit dem Charm II-Rezeptortestverfahren

Materialien und Geräte

Charm II-Gerät LSC 6600 (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

Zubehör zum Charm II-Analyzer (MCS Diagnostics, Swalmen, NL):

Vortex-Mischer

Heizblock

Zentrifuge IEC Centra CL 2

Charm Software für Bios

Kolbenhubpipetten, variabel (100 – 1000 µl) (Eppendorf AG, Hamburg)

Reagenzien

Szintillationslösung, Opti-Fluor (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

Charm II β -Lactam MRL-Test (MCS Diagnostics, Swalmen, NL):

Testtabletten TBL 8 MRL-100

Multi-Antimicrobial Standard (zur Erstellung des „Positive Control Average“)

rückstandsfreie lyophilisierte Milch (zur Erstellung des „Zero Control Average“)

Reinstwasser (MilliQ Plus, Millipore, Eschborn)

Für die Messung von Milchproben mittels des Charm II-Systems müssen folgende Testvorbereitungen getroffen werden:

a) Bestimmung des Kontrollpunktes

Der Kontrollpunkt wird durch Ermittlung des „Zero Control Average“ und des „Positive Control Average“ bestimmt.

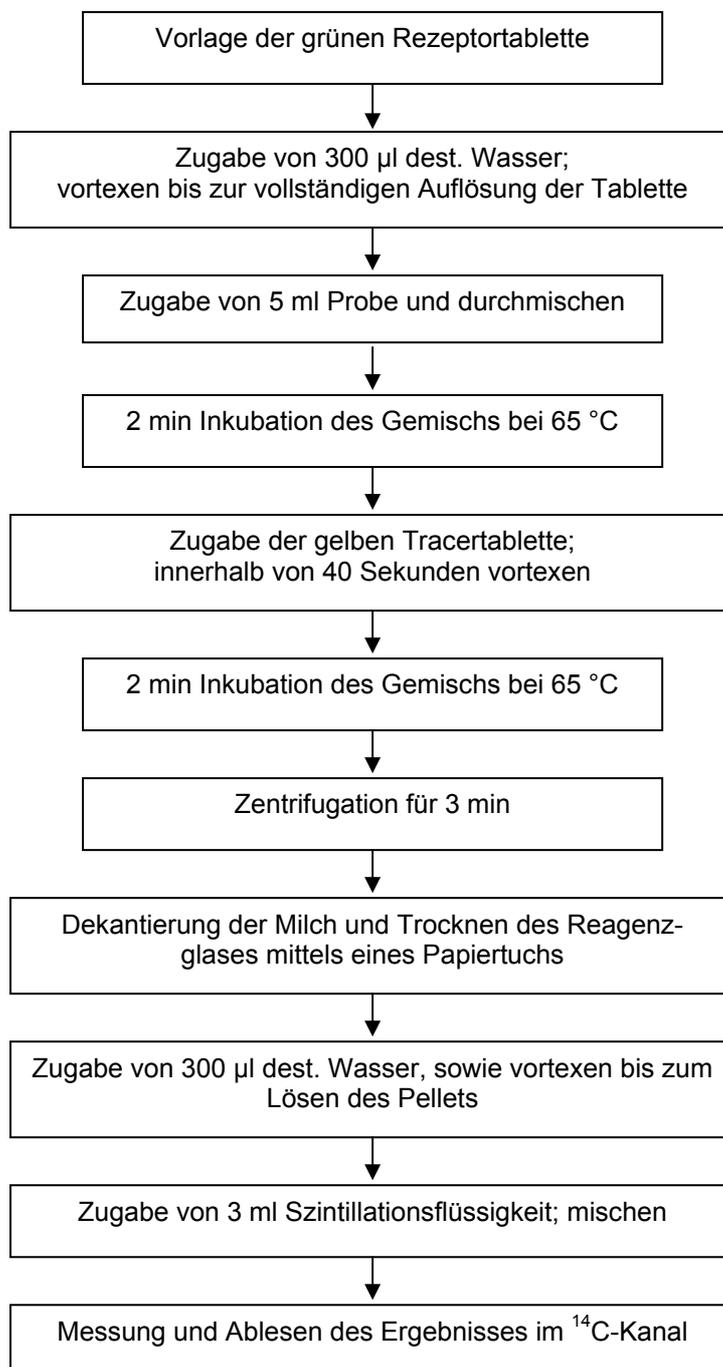
Der „Zero Control Average“ stellt dabei den Mittelwert der Negativkontrollen dar und wird durch Messung von sechs Replikaten des mitgelieferten negativen Kontrollstandards und Berechnung des Mittelwertes der „counts per minute“ (CPM) ermittelt. Der „Positive Control Average“ stellt den Mittelwert der Positivkontrollen dar und wird durch Messung von drei Proben des mitgelieferten positiven Kontrollstandards und Berechnung des Mittelwertes der CPM ermittelt.

Durch Subtraktion von 20 % vom Mittelwert der Negativkontrollen wird der eigentliche Kontrollpunkt automatisch festgelegt.

Des Weiteren muss der Heizblock auf 65°C vorgeheizt werden und die Proben müssen auf 4°C gekühlt sein.

b) Testdurchführung

Der Testablauf wird durch nachfolgendes Fließdiagramm gezeigt:



c) Auswertung

Die Charm II-Auswertung orientiert sich an dem zuvor bestimmten Kontrollpunkt, wobei ein negatives Ergebnis („not found“) bedeutet, dass der CPM (Probe) größer ist als der Kontrollpunkt. Als wahrscheinlich positiv („suspect“) gelten alle Proben, deren CPM kleiner/gleich dem Kontrollpunkt ist.

Für eine eindeutige Identifizierung von positiven Proben wurden diese noch einmal mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle zusammen gemessen.

9.7 Analysen mittels Beta Star-Test

Materialien und Geräte

Heizblock: Multi-Blok[®] Heater (LabLine Instruments Inc., Illinois)

Reagenzien

Testkit (Chr. Hansen. Hrsolm, Dänemark)

Der Beta Star-Test wurde gemäß der beiliegenden Produktinformation [134] durchgeführt. 200 µl Milch wurden mit Hilfe der im Testkit beiliegenden Spritze in das Reaktionsgefäß gegeben und mit dem lyophilisiertem Rezeptor durchmischt. In einem Heizblock wurde das Reaktionsgefäß für 3 Minuten bei 48 °C inkubiert und anschließend der Reaktionsstreifen in das Gefäß gestellt und für weitere 2 Minuten inkubiert. Anschließend konnte das Ergebnis visuell abgelesen werden. Positive Proben verursachten ein Verschwinden der ersten Bande auf dem Teststreifen. Zur Kontrolle wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativ-Probe mitgeführt.

9.8 Verwendete Software

Statistische Versuchsplanung (Experimental Design)

The Unscrambler ®, Version 9.2 (Camo Process AS, Norwegen)

Datenauswertung

Microsoft Excel Office Version 2002 (Microsoft, Unterschleißheim)

Grafik

ISIS Draw Version 2.4 (MDL Information System, San Leandro, USA)

CorelDraw Version 11 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada)

10. Literaturverzeichnis

- [1] Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J Food Prot* 61: 742-756
- [2] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vom 26.6.1990. (ABl. Nr. L 224, S.1)
- [3] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln in der Fassung vom 11.12.1998. (BGBl. I S. 3586), geändert am 19.7.2002 (BGBl. I S. 2674)
- [4] Cacciatore G, Petz M, Rachid S, Hakenbeck R, Bergwerff AA (2004) Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*. *Anal Chim Acta* 520: 105-115
- [5] Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with a special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* 10: 226-236
- [6] Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, J. O-E, G. SA (1940) Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *Lancet* II: 226-228
- [7] Bo G (2000) Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. *Clin Microbiol Infect* 6: 6-9
- [8] Löscher W, Ungemach FR, Kroker R (2003) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 6. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin, S. 214-223
- [9] Crowfoot D, Bunn CW, Rogers-Low BW, Turner-Jones A (1949) The x-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin. In: Clark HT, Johnson JR, Robinson R (Hrsg): *The chemistry of penicillins*. Princeton University Press, Princeton, S. 310-366
- [10] Holzgrabe U (2006) Von Penicillin G zu tricyclischen β -Lactamen. *Pharm Unserer Zeit* 5: 410-414
- [11] Verordnung (EWG) Nr. 675/92 der Kommission vom 18. März 1992 zur Änderung der Anhänge I und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. ABl. Nr. L 73, S. 8
- [12] Verordnung (EWG) Nr. 1299/2005 der Kommission vom 08. August 2005 zur Änderung der Anhänge I und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. ABl. Nr. L 206, S. 4
- [13] Verordnung (EWG) Nr. 546/2004 der Kommission vom 24. März 2004 zur Änderung der Anhänge I und II der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. ABl. Nr. L 087, S. 13
- [14] Gräfe U (1992) *Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 178-199

-
- [15] Arroyo M, de la Mata I, Acebal C, Castillon MP (2003) Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 507-514
- [16] Elander RP (2003) Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 385-392
- [17] Rolinson GN (1998) Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* 41: 589-603
- [18] McGregor D (1984) Penicillins. In: Lwowski W (Hrsg): *Comprehensive heterocyclic chemistry*. Pergamon Press, Oxford, Band 7, S. 299-339
- [19] Dürckheimer W, Blumbach J, Lattrell R, Scheunemann KH (1985) Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der β -Lactam-Antibiotika. *Angew. Chem.* 97: 183-205
- [20] Verordnung (EWG) Nr. 2162/2001 der Kommission vom 07. November 2001 zur Änderung der Anhänge I, II und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 291*, S. 9
- [21] Verordnung (EWG) Nr. 2728/1999 der Kommission vom 20. Dezember 1999 zur Änderung der Anhänge I, II und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 328*, S. 23
- [22] Verordnung (EWG) Nr. 061/2003 der Kommission vom 15. Januar 2003 zur Änderung der Anhänge I und II der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 11*, S. 12
- [23] Verordnung (EWG) Nr. 1553/2001 der Kommission vom 30. Juli 2001 zur Änderung des Anhangs I der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 205*, S. 16
- [24] Verordnung (EWG) Nr. 121/1998 der Kommission vom 16. Januar 1998 zur Änderung der Anhänge I, II und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 11*, S. 11
- [25] Verordnung (EWG) Nr. 807/2001 der Kommission vom 25. April 2001 zur Änderung der Anhänge I, II und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 118*, S. 6
- [26] Verordnung (EWG) Nr. 2145/2003 der Kommission vom 08. Dezember 2003 zur Änderung des Anhangs I der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Abl. Nr. L 322*, S. 5
- [27] Verordnung (EWG) Nr. 1231/2006 der Kommission vom 16. August 2006 zur Änderung der Anhänge I und II der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von

- Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Abl. Nr. L 225, S. 3
- [28] Hornish RE, Kotarski SF (2002) Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2: 717-731
- [29] Testa B, Mayer JM (2003) Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. *Chemistry, biochemistry and enzymology*. Wiley-VCH, Weinheim, S. S. 163-234
- [30] Procter P, Gensmantel N, Page M (1982) The chemical reactivity of penicillins and other β -lactam antibiotics. *J Chem Soc Perkin Trans II*: 1185-1192
- [31] Van Krimpen PC, Van Bennekom WP, Bult A (1987) Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm Weekbl Sci* 9: 1-23
- [32] Bundgaard H, Larsen C (1978) Kinetics and mechanism reaction of benzylpenicillin and ampicillin with carbohydrates and polyhydric alcohols in aqueous solution. *Arch Pharm Chem Sci* 6: 184-200
- [33] Kheirilomoon A, Kazemi-Vaysari A, Ardjmand M, Baradar-Khoshfetrat A (1999) The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling. *Process Biochemistry* 35: 205-211
- [34] Rose MD, Bygrave J, Farrington WHH, Shearer G (1997) The effect of cooking on veterinary drug residues in food. Part 8. Benzylpenicillin. *Analyst* 122: 1095-1099
- [35] Page M (1987) The mechanism of reactions of β -lactam antibiotics. *Adv Phys Org Chem* 23: 165-270
- [36] Goffin C, Ghuysen JM (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1079-1093
- [37] Kaiser G, Kukolja S (1972) Modification of the β -lactam system. In: Flynn E (Hrsg): *Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology*. Academic Press, New York, S. 125-133
- [38] Llinás A, Vilanova B, Frau J, Munoz F, Donoso J, Page MJ (1998) Chemical Reactivity of Penicillins and Cephalosporins. Intramolecular Involvement of the Acyl-Amido Side Chain. *J. Org. Chem.* 63: 9052-9060
- [39] Page M (1984) The mechanism of reactions of β -lactam antibiotics. *Acc Chem Res* 17: 144-151
- [40] Yamana T, Tsuji A (1976) Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanisms of degradation. *J Pharm Sci* 65: 1563-1574
- [41] Madigan MT, Martinko JM (2006) *Brock Mikrobiologie*. Pearson Education Inc., Berlin, S. 81-89
- [42] Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 159-184
- [43] Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J (1998) Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1371-1414
- [44] Lengeler J, Drews G, Schlegel H (1999) *Biology of the prokaryotes*. Thieme, Stuttgart, S. 27-36
- [45] Heisig P (2006) Wirkungs- und Resistenzmechanismen der β -Lactam-Antibiotika. *Pharm Unserer Zeit* 5: 400-408
- [46] van Heijenoort J (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11: 25R-36R

-
- [47] Terrak M, Ghosh TK, van Heijenoort J, Van Beeumen J, Lampilas M, Aszodi J, Ayala JA, Ghuysen JM, Nguyen-Disteche M (1999) The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34: 350-364
- [48] Koch AL (2000) The exoskeleton of bacterial cells (the sacculus): still a highly attractive target for antibacterial agents that will last for a long time. *Crit Rev Microbiol* 26: 1-35
- [49] Höltje JV (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 164: 243-254
- [50] Höltje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 181-203
- [51] Bayles KW (2000) The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol* 8: 274-278
- [52] Koch AL, Woeste S (1992) Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 4811-4819
- [53] Tipper DJ, Strominger JL (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1133-1141
- [54] Frau J, Price SL (1995) On the electrostatic and steric similarity of lactam compounds and the natural substrate for bacterial cell-wall biosynthesis. *J Comput-Aided Mol Des* 10: 107-122
- [55] Lamotte J, Dive G, Ghuysen JM (1991) Conformational analysis of β and γ -lactam antibiotics. *Eur J Med Chem* 26: 43-50
- [56] Ghuysen JM (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* 45: 37-67
- [57] Goffin C, Ghuysen JM (2002) Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 702-738
- [58] Waxman DJ, Strominger JL (1983) Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 52: 825-869
- [59] Adriaens P, Meesschaert B, Frère JM, Vanderhaeghe H, Degelaen J, Ghuysen JM, Eyssen H (1978) Stability of D-5,5-dimethyl- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid in relation to its possible occurrence as a degradation product of penicillin by the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and the membrane-bound dd-carboxypeptidase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 253: 3660-3665
- [60] Frère JM, Ghuysen JM, Perkins HR (1975) Interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61, substrate and beta-lactam antibiotics. A choice of models. *Eur J Biochem* 57: 353-359
- [61] Nicholas RA, Strominger JL (1988) Site-directed mutants of a soluble form of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli* and their catalytic properties. *J Biol Chem* 263: 2034-2040
- [62] Williamson R, Hakenbeck R, Tomasz A (1980) The penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* grown under lysis-permissive and lysis-protective (tolerant) conditions. *FEMS Microbiol Lett* 7: 127-131
- [63] Höltje JV, Heidrich C (2001) Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* 83: 103-108

- [64] Schwartz B, Markwalder JA, Wang Y (2001) Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin binding protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* 123: 11638-11643
- [65] Schmitt S, Kuhn D, Klebe G (2002) A new method to detect related function among proteins independent of sequence and fold homology. *J Mol Biol* 332: 387-406
- [66] Sun Y, Bauer MD, Lu W (1998) Identification of the active site serine of penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 33: 1009-1016
- [67] van der Linden MP, de Haan L, Dideberg O, Keck W (1994) Site-directed mutagenesis of proposed active-site residues of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*. *Biochem J* 303 (Pt 2): 357-362
- [68] Waxman DJ, Strominger JL (1980) Sequence of active site peptides from the penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. Mechanism of penicillin action and sequence homology to beta-lactamases. *J Biol Chem* 255: 3964-3976
- [69] Adam M, Fraipont C, Rhazi N, Nguyen-Disteche M, Lakaye B, Frère JM, Devreese B, Van Beeumen J, van Heijenoort Y, van Heijenoort J, Ghuysen JM (1997) The bimodular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. *J Bacteriol* 179: 6005-6009
- [70] Di Guilmi AM, Mouz N, Andrieu JP, Hoskins J, Jaskunas SR, Gagnon J, Dideberg O, Vernet T (1998) Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J Bacteriol* 180: 5652-5659
- [71] Duez C, Vanhove M, Gallet X, Bouillenne F, Docquier J, Brans A, Frère JM (2001) Purification and characterization of PBP4a, a new low-molecular-weight penicillin-binding protein from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 1595-1599
- [72] Duval V, Swinnen M, Lepage S, Brans A, Granier B, Franssen C, Frère JM, Joris B (2003) The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of beta-lactamase synthesis. *Mol Microbiol* 48: 1553-1564
- [73] Frère JM, Joris B (1985) Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit Rev Microbiol* 11: 299-396
- [74] Jamin M, Damblon C, Millier S, Hakenbeck R, Frère JM (1993) Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with beta-lactams. *Biochem J* 292: 735-741
- [75] Jamin M, Hakenbeck R, Frere JM (1993) Penicillin binding protein 2x as a major contributor to intrinsic beta-lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett* 331: 101-104
- [76] Lepage S, Lakaye B, Galleni M, Thamm I, Crine M, Gros Lambert S, Frere JM (1995) Saturation of penicillin-binding protein 1 by beta-lactam antibiotics in growing cells of *Bacillus licheniformis*. *Mol Microbiol* 16: 365-372
- [77] Nicholas RA, Krings S, Tomberg J, Nicola G, Davies C (2003) Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*: implications for deacylation of the acyl-enzyme complex. *J Biol Chem* 278: 52826-52833

-
- [78] Blumberg PM, Strominger JL (1971) Inactivation of D-alanine carboxypeptidase by penicillins and cephalosporins is not lethal in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2814-2817
- [79] Frère JM, Ghuysen JM, Iwatsubo M (1975) Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces R61* and beta-lactam antibiotics. A choice of models. *Eur J Biochem* 57: 343-351
- [80] Philippon A, Dusart J, Joris B, Frere JM (1998) The diversity, structure and regulation of beta-lactamases. *Cell Mol Life Sci* 54: 341-346
- [81] Laible G, Keck W, Lurz R, Mottl H, Frere JM, Jamin M, Hakenbeck R (1992) Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. Expression in *Escherichia coli* and purification of a soluble enzymatically active derivative. *Eur J Biochem* 207: 943-949
- [82] Baquero F (1997) Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 39 Suppl A: 1-6
- [83] McCormick AW, Whitney CG, Farley MM, Lynfield R, Harrison LH, Bennett NM, Schaffner W, Reingold A, Hadler J, Cieslak P, Samore MH, Lipsitch M (2003) Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Nat Med* 9: 424-430
- [84] Sturenburg E, Mack D (2003) Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 47: 273-295
- [85] Olesky M, Hobbs M, Nicholas RA (2002) Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2811-2820
- [86] Lu WP, Kincaid E, Sun Y, Bauer MD (2001) Kinetics of beta-lactam interactions with penicillin-susceptible and -resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Involvement of acylation and deacylation in beta-lactam resistance. *J Biol Chem* 276: 31494-31501
- [87] Lu WP, Sun Y, Bauer MD, Paule S, Koenigs PM, Kraft WG (1999) Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with beta-lactams using electrospray mass spectrometry. *Biochemistry* 38: 6537-6546
- [88] Pernot L, Chesnel L, Le Gouellec A, Croize J, Vernet T, Dideberg O, Dessen A (2004) A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem* 279: 16463-16470
- [89] Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA (2002) Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 769-777
- [90] Dougherty TJ (1985) Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to beta-lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 90-95
- [91] Grebe T, Hakenbeck R (1996) Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 829-834
- [92] Hakenbeck R, Coyette J (1998) Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 54: 332-340

- [93] Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A (1980) Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 364-371
- [94] Hartman BJ, Tomasz A (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513-516
- [95] Laible G, Hakenbeck R (1991) Five independent combinations of mutations can result in low-affinity penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 173: 6986-6990
- [96] Ligozzi M, Pittaluga F, Fontana R (1996) Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 354-357
- [97] Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC (2002) Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1273-1280
- [98] Sifaoui F, Arthur M, Rice L, Gutmann L (2001) Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2594-2597
- [99] Abraham EP, Chain E (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837
- [100] Massova I, Kollman PA (2002) pKa, MM, and QM studies of mechanisms of beta-lactamases and penicillin-binding proteins: acylation step. *J Comput Chem* 23: 1559-1576
- [101] Ambler RP (1980) The structure of beta-lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B* 289: 321-331
- [102] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233
- [103] Joris B, Ledent P, Dideberg O, Fonze E, Lamotte-Brasseur J, Kelly JA, Ghuysen JM, Frere JM (1991) Comparison of the sequences of class A beta-lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2294-2301
- [104] Koch AL (2000) Penicillin binding proteins, beta-lactams, and lactamases: offensives, attacks, and defensive countermeasures. *Crit Rev Microbiol* 26: 205-220
- [105] Massova I, Mobashery S (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1-17
- [106] Peimbert M, Segovia L (2003) Evolutionary engineering of a β -lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold. *Protein Eng* 16: 27-35
- [107] Saves I, Burlet-Schiltz O, Swaren P, Lefevre F, Masson JM, Prome JC, Samama JP (1995) The asparagine to aspartic acid substitution at position 276 of TEM-35 and TEM-36 is involved in the beta-lactamase resistance to clavulanic acid. *J Biol Chem* 270: 18240-18245
- [108] Kroker R (2002) *Kompaktwissen Tierarzneimittelrückstände*. Behrs Verlag, Hamburg, S. 12-17
- [109] Schneiderei M (14.-16.9.2006) Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin-Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen.

- Vortrag anlässlich der 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie in Bonn. www.bft-online.de/aktuelles.htm
- [110] Wittkowski G (2002) Resistenzentwicklung und Folgen aus tierärztlicher Sicht. In: Akademie für Tiergesundheit. Schriftenreihe der Akademie für Tiergesundheit - Zur Sicherheit von Tierarzneimitteln. Enke Verlag, Stuttgart, 8, S. 153-158
- [111] Mayr A (1984) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler. 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 693-730
- [112] Chambers HF, Neu H (1995) Penicillins. In: Mandell G, Douglas R, Bennett J (Hrsg): Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, 4. Auflage, S. 233-246
- [113] Cole M, Kenig MD, Hewitt VA (1973) Metabolism of penicillins to penicilloic acids and 6-aminopenicillanic acid in man and its significance in assessing penicillin absorption. *Antimicrob Agents Chemother* 3: 463-468
- [114] Heller DN, Kaplan DA, Rummel NG, von Bredow J (2000) Identification of cephapirin metabolites and degradants in bovine milk by electrospray ionization--ion trap tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 48: 6030-6035
- [115] Moats WA, Anderson KL, Rushing JE, Buckley S (2000) Conversion of cephapirin to deacetylcephapirin in milk and tissues of treated animals. *J Agric Food Chem* 48: 498-502
- [116] Suwanrumpha S, Freas RB (1989) Identification of metabolites of ampicillin using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 18: 983-994
- [117] DiPiro JT, Adkinson NF, Jr., Hamilton RG (1993) Facilitation of penicillin haptentation to serum proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1463-1467
- [118] Pichichero ME (2005) A review of evidence supporting the American Academy of Pediatrics. Recommendation for prescribing cephalosporin antibiotics for penicillin-allergic patients. *Pediatrics* 115: 1048-1057
- [119] Sendzik J, Stahlmann R (2006) Unerwünschte Wirkungen der β -Lactam-Antibiotika. *Pharm Unserer Zeit* 5: 432-437
- [120] Dayan AD (1993) Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. *Vet Microbiol* 35: 213-226
- [121] Dewdney JM, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschueren C (1991) Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem Toxicol* 29: 477-483
- [122] EMEA, Summary report, Penicillins.
- [123] Produktinformation BRT-Hemmstofftestsysteme, Analytik in Milch. Produktions- und Vertriebs-GmbH. München, Deutschland, www.aim-bayern.de
- [124] Produktinformation Delvotest. DSM Food Specialties. Delft, Niederlande, www.dsm.com
- [125] Produktinformation CMT - Copan Milk Test. Copan Italia. Brescia, Italien, www.copanswabs.com
- [126] Produktinformation Eclipse. Zeu Immunotec. Zaragoza, Spanien, www.zeu-immunotec.com
- [127] Produktinformation BR-Test, AS Brillant. DSM Food Specialties. Delft, Niederlande, www.dsm.com

- [128] Produktinformation Premi-Test. DSM PremiTest. Heerlen, Niederlande, www.premitest.com
- [129] Produktinformation CowSide Test. Charm Sciences, Inc., Lawrence, Massachusetts, USA; www.charm.com
- [130] Kraack J, Tolle A (1967) Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bacillus stearthermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch. *Milchwissenschaft* 11: 669-673
- [131] Althaus RL, Torres A, Montero A, Balasch S, Molina MP (2003) Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest photometric measurements. *J Dairy Sci* 86: 457-463
- [132] Produktinformation β -Lactam ELISA (Penicilline). Randox Laboratories Ltd., UK; Vertrieb durch Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim, www.coring.de
- [133] Crowther JR (1995) ELISA. Theory and practice. In: Walker JM (Hrsg): *Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, 42, S.
- [134] Produktinformation Beta-Star-Test, Testsysteme zum Nachweis von Antibiotika. Chr. Hansen. Hrsolm, Dänemark:
- [135] Charm SE, Chi R (1988) Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 71: 304-316
- [136] Produktinformation Charm ROSA. Charm Sciences, Inc., Lawrence, Massachusetts, USA; www.charm.com
- [137] Angelidis AS, Farver TB, Cullor JS (1999) Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J Food Prot* 62: 1183-1190
- [138] Bell C, Rhoades JR, Neaves P, Scanella D (1995) An evaluation of the IDEXX SNAP test for the detection of β -lactam antibiotics in ex-farm milk. *Neth Milk Dairy J* 49: 15-25
- [139] Frère JM, Klein D, Ghuysen JM (1980) Enzymatic method for rapid and sensitive determination of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 506-510
- [140] Gustavsson E (2003) SPR biosensor analysis of β -lactam antibiotics in milk. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences
- [141] Cacciatore G (2005) Screening auf Rückstände on β -Lactam-Antibiotika in Milch: Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Penicillin-bindenden Proteinen. Dissertation. Bergische Universität Wuppertal
- [142] Diserens J (2002) Schnelltestmethoden. Arbeitsgruppe "Pharmakologisch wirksame Stoffe" in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker), www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/pharma.htm.
- [143] 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. August 2002, (ABI L 221, S. 8). In:
- [144] Abjean JP, Lahogue V (1997) Planar chromatography for quantitative determination of ampicillin residues in milk and muscle. *J AOAC Int* 80: 1171-1176
- [145] Meetschen U, Petz M (1991) Gaschromatographische Analysenmethode für Rückstände von sieben Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. *Z Lebensm Unters Forsch* 193: 337-343

- [146] Hernandez M, Borrull F, Calull M (1999) Determination of amoxicillin in plasma samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 731: 309-315
- [147] Boison JO (1992) Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance. *J Chromatogr* 624: 171-194
- [148] Schenck FJ, Callery PS (1998) Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A* 812: 99-109
- [149] Takeba K, Fujinuma K, Miyazaki T, Nakazawa H (1998) Simultaneous determination of beta-lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr A* 812: 205-211
- [150] Moats WA, Romanowski RD (1998) Multiresidue determination of beta-lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *J Chromatogr A* 812: 237-247
- [151] Mascher HJ, Kikuta C (1998) Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatisation. *J Chromatogr A* 812: 221-226
- [152] Furusawa N (2000) Rapid liquid chromatographic determination of residual penicillin G in milk. *Fresenius J Anal Chem* 368: 624-626
- [153] Boison JO, Salisbury CD, Chan W, MacNeil JD (1991) Determination of penicillin G residues in edible animal tissues by liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 74: 497-501
- [154] Petz M (1999) Comparison of chromatographic procedures for determining residues of penicillins. In: Agarwal VK (Hrsg): *Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin*. Plenum Press, New York, S. 147-163
- [155] Bergwerff AA, Schlösser J (2003) Residue Determination. In: Caballero B, Trugo L, Finglas P (Hrsg): *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, London, 1, S. 254-261
- [156] Becker M, Zittlau E, Petz M (2004) Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 520: 19-32
- [157] Bruno F, Curini R, di Corcia A, Nazzari M, Samperi R (2001) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. *J Agric Food Chem* 49: 3463-3470
- [158] Ito Y, Ikai Y, Oka H, Matsumoto H, Miyazaki Y, Takeba K, Nagase H (2001) Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis IV. Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin, in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 911: 217-223
- [159] Fagerquist CK, Lightfield AR (2003) Confirmatory analysis of beta-lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 660-671
- [160] Heller DN, Ngoh MA (1998) Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for the confirmation of seven beta-lactam antibiotics in bovine milk. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 2031-2040
- [161] Daeseleire E, De Ruyck H, Van Renterghem R (2000) Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using

- liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14: 1404-1409
- [162] Riediker S, Diserens JM, Stadler RH (2001) Analysis of beta-lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 49: 4171-4176
- [163] Preu M (1999) *Experimental Design in der Rückstandsanalytik: Optimierung von GC/MS-Verfahren für die Analytik von Aminoglycosiden und Penicillinen*. Dissertation. Bergische Universität Wuppertal
- [164] Deming SN, Morgan SL (1993) *Experimental design: a chemometric approach*. 2. Auflage, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, S.
- [165] Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström A, Pettersen J, Bergman R (1998) Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42: 3-40
- [166] Esbensen KH (2002) *Multivariate Data Analysis - In Practice*. 5. Auflage, CAMO Process AS, Oslo, Norwegen, S.
- [167] Deming SN, Palasota JA, Palasota JM (1991) Experimental Design in Chemometrics. *Journal of Chemometrics* 5: 181-192
- [168] CAMO (1998) *The Unscrambler - User Manual*. CAMO Process AS, Oslo, Norwegen, S.
- [169] Bosque-Sendra JM, Pescarolo S, Cuadros-Rodríguez L, García-Campana AM, Almansa-López EM (2001) Optimizing analytical methods using sequential response surface methodology. Application to the pararosanine determination of formaldehyde. *Fresenius J Anal Chem* 369: 715-718
- [170] Fabre H (1996) Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 14: 1125-1132
- [171] Vander Heyden Y, Questier F, Massart DL (1998) A ruggedness test strategy for procedure related factors: experimental set-up and interpretation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17: 153-168
- [172] Vander Heyden Y, Questier F, Massart DL (1998) Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18: 43-56
- [173] Campisi B, Chicco D, Vojnovic D, Phan-Tan-Luu R (1998) Experimental design for a pharmaceutical formulation: optimisation and robustness. *J Pharm Biomed Anal* 18: 57-65
- [174] Vander Heyden Y, Jimidar M, Hund E, Niemeijer N, Peeters R, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, Hoogmartens J (1999) Determination of system suitability limits with a robustness test. *J. Chromatogr. A* 845: 145-154
- [175] Vander Heyden Y, Bourgeois A, Massart DL (1997) Influence of the sequence of experiments in a ruggedness test when drift occurs. *Anal Chim Acta* 347: 369-384
- [176] Vander Heyden Y, Luypaert K, Hartmann C, Massart DL, Hoogmartens J, De Beer J (1995) Ruggedness tests on the high-performance liquid chromatography assay of the United States Pharmacopeia XXII for tetracycline hydrochloride. A comparison of experimental designs and statistical interpretations. *Anal Chim Acta* 312: 245-262
- [177] Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA (2000) A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* 233: 47-56

-
- [178] Deutsches Institut für Normung (1995) Rahmenbedingugne für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. DIN V 38415-2
- [179] Deutsches Institut für Normung (1994) Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. DIN 32 645
- [180] Hennion M-C (1998) Applications and validation of immunoassays for pesticides analysis. *Analisis Magazine* 26: M 149-M 155
- [181] Usleber E, Litz S, Märtlbauer E (1998) Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibodies. *Food Agric Immunol* 10: 317-324
- [182] Märtlbauer E (1993) Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- [183] Litz S (1995) Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München
- [184] Schneider RJ, Goldbach HE, Uhlig S, Becher M (2001) Validierung neuer kostengünstiger Nachweisverfahren (Immunoassay) für Pestizide. 41.01, Umweltbundesamt, Berlin, S. 1-125
- [185] Zhao G, Meier TI, Kahl SD, Gee KR, Blaszczyk LC (1999) BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1124-1128
- [186] Esser P Principles in Adsorption to Polystyrene. *Nunc Bulletin* No.6, Wiesbaden
- [187] Beck Henzelin A, Le Breton M-H, Diserens J-M (2006) Antibiotic residues in milk. Comparative study and validation of Twinsensor and Charm ROSA for simultaneous detection of tetracyclines and β -Lactams. Poster. 5th Int. Symp. Hormone Vet. Drug Anal. Antwerpen
- [188] Becker M (2005) LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-Antibiotika. Dissertation. Bergische Universität Wuppertal
- [189] Kulmbacher Reihe (1986) Chemisch-physikalische Merkmale der Fleischqualität. Band 6, Förderergesellschaft der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, S. 89-110
- [190] Petz M, Kan CA (2000) Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. Symposium on Agrochemical Residues in Eggs: 6.5 A-G
- [191] Suhren G, Knappstein K, Walte H-G (2005) Influence of milking frequencies in automatic milking systems on extraction characteristics of different antibiotics in milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 57: 215-261
- [192] Suhren G, Walte H-G (2003) Experiences with the application of method combinations for the detection of residues of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers. *Milchwissenschaft* 58: 536-540
- [193] Suhren G, Knappstein K (2003) Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods. *Anal. Chim. Acta* 483: 363-372
- [194] Lesnik B (1994) Immunoassay Methods: Development and Implementation Programme at the USEPA. *Food & Agricultural Immunology* 6: 251-259
- [195] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- [196] Lämmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| AMPI | Ampicillin |
| 6-APA | 6-Aminopenicillansäure |
| BfEL | Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel |
| BfT | Bundesverband für Tiergesundheit |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| Da | Dalton |
| DIG | Digoxigenin |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| EU | Europäische Union |
| GDCh | Gesellschaft Deutscher Chemiker |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HMW PBP | PBP mit hohem Molekulargewicht |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactosid |
| LC | Liquid Chromatography |
| LFGB | Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MRL | Maximum Residue Limit |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| Pen G | Benzylpenicillin |
| PBP | Penicillin-bindendes Protein |
| PBS | Phosphate-bufferd saline |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SPR | Surface plasmon resonance |
| TMB | Tetramethylbenzidin |

Anhang I: Experimenteller Plan und Responsewerte des Fractional Factorial Screening-Designs

| | PBP Be- schichtung (ng/100µl) | DIG-AMPI- Verdünnung 1:x | F _{ab} Fragmente 1: x | Inkubation Penicillin (Minuten) | Inkubation DIG-AMPI (Minuten) | Inkubation F _{ab} Fragmente | Extinktion |
|----------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--|------------|
| Cube001a | 100 | 1.0e+04 | 1.000 | 15 | 15 | 30 | 1.127 |
| Cube001b | 100 | 1.0e+04 | 1.000 | 15 | 15 | 30 | 1.280 |
| Cube001c | 100 | 1.0e+04 | 1.000 | 15 | 15 | 30 | 1.277 |
| Cube002a | 500 | 1.0e+04 | 1.000 | 15 | 60 | 30 | 4.000 |
| Cube002b | 500 | 1.0e+04 | 1.000 | 15 | 60 | 30 | 4.000 |
| Cube002c | 500 | 1.0e+04 | 1.000 | 15 | 60 | 30 | 4.000 |
| Cube003a | 100 | 1.0e+05 | 1.000 | 15 | 60 | 60 | 0.867 |
| Cube003b | 100 | 1.0e+05 | 1.000 | 15 | 60 | 60 | 0.880 |
| Cube003c | 100 | 1.0e+05 | 1.000 | 15 | 60 | 60 | 0.831 |
| Cube004a | 500 | 1.0e+05 | 1.000 | 15 | 15 | 60 | 3.217 |
| Cube004b | 500 | 1.0e+05 | 1.000 | 15 | 15 | 60 | 3.111 |
| Cube004c | 500 | 1.0e+05 | 1.000 | 15 | 15 | 60 | 3.260 |
| Cube005a | 100 | 1.0e+04 | 3.000 | 15 | 60 | 60 | 0.670 |
| Cube005b | 100 | 1.0e+04 | 3.000 | 15 | 60 | 60 | 0.672 |
| Cube005c | 100 | 1.0e+04 | 3.000 | 15 | 60 | 60 | 0.660 |
| Cube006a | 500 | 1.0e+04 | 3.000 | 15 | 15 | 60 | 2.319 |
| Cube006b | 500 | 1.0e+04 | 3.000 | 15 | 15 | 60 | 2.372 |
| Cube006c | 500 | 1.0e+04 | 3.000 | 15 | 15 | 60 | 2.341 |
| Cube007a | 100 | 1.0e+05 | 3.000 | 15 | 15 | 30 | 0.244 |
| Cube007b | 100 | 1.0e+05 | 3.000 | 15 | 15 | 30 | 0.246 |
| Cube007c | 100 | 1.0e+05 | 3.000 | 15 | 15 | 30 | 0.240 |
| Cube008a | 500 | 1.0e+05 | 3.000 | 15 | 60 | 30 | 1.175 |
| Cube008b | 500 | 1.0e+05 | 3.000 | 15 | 60 | 30 | 1.169 |
| Cube008c | 500 | 1.0e+05 | 3.000 | 15 | 60 | 30 | 1.173 |
| Cube009a | 100 | 1.0e+04 | 1.000 | 60 | 15 | 60 | 0.910 |
| Cube009b | 100 | 1.0e+04 | 1.000 | 60 | 15 | 60 | 0.940 |
| Cube009c | 100 | 1.0e+04 | 1.000 | 60 | 15 | 60 | 0.959 |
| Cube010a | 500 | 1.0e+04 | 1.000 | 60 | 60 | 60 | 4.000 |
| Cube010b | 500 | 1.0e+04 | 1.000 | 60 | 60 | 60 | 4.000 |
| Cube010c | 500 | 1.0e+04 | 1.000 | 60 | 60 | 60 | 4.000 |
| Cube011a | 100 | 1.0e+05 | 1.000 | 60 | 60 | 30 | 0.346 |
| Cube011b | 100 | 1.0e+05 | 1.000 | 60 | 60 | 30 | 0.340 |
| Cube011c | 100 | 1.0e+05 | 1.000 | 60 | 60 | 30 | 0.351 |
| Cube012a | 500 | 1.0e+05 | 1.000 | 60 | 15 | 30 | 1.288 |
| Cube012b | 500 | 1.0e+05 | 1.000 | 60 | 15 | 30 | 1.219 |
| Cube012c | 500 | 1.0e+05 | 1.000 | 60 | 15 | 30 | 1.170 |
| Cube013a | 100 | 1.0e+04 | 3.000 | 60 | 60 | 30 | 0.433 |
| Cube013b | 100 | 1.0e+04 | 3.000 | 60 | 60 | 30 | 0.420 |
| Cube013c | 100 | 1.0e+04 | 3.000 | 60 | 60 | 30 | 0.445 |
| Cube014a | 500 | 1.0e+04 | 3.000 | 60 | 15 | 30 | 1.675 |
| Cube014b | 500 | 1.0e+04 | 3.000 | 60 | 15 | 30 | 1.615 |
| Cube014c | 500 | 1.0e+04 | 3.000 | 60 | 15 | 30 | 1.556 |
| Cube015a | 100 | 1.0e+05 | 3.000 | 60 | 15 | 60 | 0.134 |
| Cube015b | 100 | 1.0e+05 | 3.000 | 60 | 15 | 60 | 0.120 |
| Cube015c | 100 | 1.0e+05 | 3.000 | 60 | 15 | 60 | 0.150 |
| Cube016a | 500 | 1.0e+05 | 3.000 | 60 | 60 | 60 | 1.652 |
| Cube016b | 500 | 1.0e+05 | 3.000 | 60 | 60 | 60 | 1.659 |
| Cube016c | 500 | 1.0e+05 | 3.000 | 60 | 60 | 60 | 1.684 |
| Cent-a | 300 | 5.5e+04 | 2.000 | 37.5 | 37.5 | 45 | 1.932 |
| Cent-b | 300 | 5.5e+04 | 2.000 | 37.5 | 37.5 | 45 | 1.890 |
| Cent-c | 300 | 5.5e+04 | 2.000 | 37.5 | 37.5 | 45 | 1.878 |

Anhang II: Experimenteller Plan und Responsewerte der Optimierung mittels Box-Behnken-Design

| | PBP- Beschichtung (ng/100µl) | DIG-AMPI- Verdünnung 1:x | F_{ab} Fragmente Verdünnung 1: x | Extinktion |
|-----------------|---|---|---|-------------------|
| Cube001a | 100 | 4.0e+04 | 1.500 | 0.671 |
| Cube001b | 100 | 4.0e+04 | 1.500 | 0.706 |
| Cube001c | 100 | 4.0e+04 | 1.500 | 0.675 |
| Cube002a | 200 | 4.0e+04 | 1.500 | 1.251 |
| Cube002b | 200 | 4.0e+04 | 1.500 | 1.250 |
| Cube002c | 200 | 4.0e+04 | 1.500 | 1.293 |
| Cube003a | 100 | 6.0e+04 | 1.500 | 0.515 |
| Cube003b | 100 | 6.0e+04 | 1.500 | 0.455 |
| Cube003c | 100 | 6.0e+04 | 1.500 | 0.472 |
| Cube004a | 200 | 6.0e+04 | 1.500 | 0.930 |
| Cube004b | 200 | 6.0e+04 | 1.500 | 0.894 |
| Cube004c | 200 | 6.0e+04 | 1.500 | 0.851 |
| Cube005a | 100 | 5.0e+04 | 1.000 | 0.884 |
| Cube005b | 100 | 5.0e+04 | 1.000 | 0.882 |
| Cube005c | 100 | 5.0e+04 | 1.000 | 0.872 |
| Cube006a | 200 | 5.0e+04 | 1.000 | 1.609 |
| Cube006b | 200 | 5.0e+04 | 1.000 | 1.609 |
| Cube006c | 200 | 5.0e+04 | 1.000 | 1.608 |
| Cube007a | 100 | 5.0e+04 | 2.000 | 0.431 |
| Cube007b | 100 | 5.0e+04 | 2.000 | 0.450 |
| Cube007c | 100 | 5.0e+04 | 2.000 | 0.471 |
| Cube008a | 200 | 5.0e+04 | 2.000 | 0.659 |
| Cube008b | 200 | 5.0e+04 | 2.000 | 0.656 |
| Cube008c | 200 | 5.0e+04 | 2.000 | 0.652 |
| Cube009a | 150 | 4.0e+04 | 1.000 | 1.332 |
| Cube009b | 150 | 4.0e+04 | 1.000 | 1.418 |
| Cube009c | 150 | 4.0e+04 | 1.000 | 1.394 |
| Cube010a | 150 | 6.0e+04 | 1.000 | 1.112 |
| Cube010b | 150 | 6.0e+04 | 1.000 | 1.121 |
| Cube010c | 150 | 6.0e+04 | 1.000 | 1.110 |
| Cube011a | 150 | 4.0e+04 | 2.000 | 0.801 |
| Cube011b | 150 | 4.0e+04 | 2.000 | 0.829 |
| Cube011c | 150 | 4.0e+04 | 2.000 | 0.805 |
| Cube012a | 150 | 6.0e+04 | 2.000 | 0.558 |
| Cube012b | 150 | 6.0e+04 | 2.000 | 0.556 |
| Cube012c | 150 | 6.0e+04 | 2.000 | 0.504 |
| Cent-a | 150 | 5.0e+04 | 1.500 | 0.904 |
| Cent-b | 150 | 5.0e+04 | 1.500 | 0.924 |
| Cent-c | 150 | 5.0e+04 | 1.500 | 0.879 |
| Cent-d | 150 | 5.0e+04 | 1.500 | 0.884 |
| Cent-e | 150 | 5.0e+04 | 1.500 | 0.872 |
| Cent-f | 150 | 5.0e+04 | 1.500 | 0.930 |

Anhang III: Ergebnisse der Analysen (HPLC, verschiedene Screening-Tests) der Milchproben, die aus Medikationsstudien des Instituts für Hygiene und Produktsicherheit (BfEL, Kiel) stammten, und Vergleich mit den mittels Mikrotiterplattentest (MTP) erhaltenen Ergebnissen

Milchproben mit Benzylpenicillin (PenG)-Rückständen

| Lfd.Nr | Milchproben mit PenG (HPLC) BfEL, Juni '03 Gehalt in µg/kg | Milchproben mit PenG (MTP) Wuppertal '06 Gehalt in µg/kg | Delvo SP visuell betimmt | Delvo MCS visuell betimmt | Copan visuell betimmt | BRASp visuell betimmt | BRT visuell betimmt | Beta star visuell betimmt |
|--------|--|--|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 1 | <LOD | < NWG | 2 | | | 1 | 3 | 1 |
| 2 | 6,9 | > obere NWG | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 3 | <LOD | < NWG | 1 | | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 4 | <LOD | < NWG | 1 | | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 5 | <LOD | < NWG | 1 | | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 6 | 23,3 | > obere NWG | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 7 | 1,8 | 2,3 | 2 | | 2 | 4 | 3 | 1 |
| 8 | <LOD | ≤ NWG (1,1) | 1 | | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 9 | <LOD | ≤ NWG (1,1) | 2 | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 15,9 | > obere NWG | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 11 | 2,6 | 4,9 | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 12 | <LOD | ≤ NWG (1,1) | 1 | | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 13 | 5,9 | 6 | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 14 | 1 | 1,8 | 2 | | 1 | 1 | 2 | 3 |
| 15 | <LOD | ≤ NWG (1,2) | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | <LOD | < NWG | 1 | | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 2,1 | 2 | 3 | | 3 | 3 | 1 | 1 |
| 18 | 0,6 | < NWG | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 19 | 0,6 | 1,2 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 20 | 0,9 | 1,0 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 21 | <LOD | ≤ NWG (1,0) | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 22 | 5,2 | 6,2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 23 | 1 | 1,0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 24 | 1 | < NWG | 2 | 3 | 1 | 1 | | 4 |
| 25 | <LOD | 1,6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 26 | 12 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| 27 | 7 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| 28 | 132,3 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| 29 | <LOD | ≤ NWG (1,0) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 30 | <LOD | < NWG | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 31 | 6,2 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| 32 | 1 | 2,3 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | |
| 33 | <LOD | 1,9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 34 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | |
| 35 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | |
| 36 | 2,3 | 3,2 | 4 | | | 4 | 4 | 3 |
| 37 | <LOD | 1,7 | 2 | | | 1 | 1 | 1 |
| 38 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| 39 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | |
| 40 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | |
| 41 | 6,1 | 6 | 4 | | | 4 | 4 | 4 |
| 42 | 1,9 | ≤ NWG (1,0) | 4 | | | 4 | 4 | 3 |

Fortsetzung Benzylpenicillin

| | | | | | | | | |
|----|------|--------------------|---|--|--|---|---|---|
| 43 | <LOD | \leq NWG (1,1) | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| 44 | <LOD | \leq NWG (1,2) | 1 | | | 1 | 1 | |
| 45 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | |
| 46 | <LOD | \leq NWG (1,2) | 1 | | | 1 | 1 | |
| 47 | 12,3 | > obere NWG (> 10) | 4 | | | 4 | 4 | 4 |
| 48 | 2,2 | 3,5 | 4 | | | 4 | 4 | 4 |
| 49 | <LOD | \leq NWG (1,1) | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| 50 | <LOD | 1,5 | 1 | | | 1 | 1 | |
| 51 | <LOD | \leq NWG (1,0) | 1 | | | 1 | 1 | |
| 52 | 2,4 | 4,3 | 4 | | | 4 | 3 | 4 |
| 53 | <LOD | 1,6 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| 54 | <LOD | \leq NWG (1,0) | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| 55 | <LOD | < NWG | 1 | | | 1 | 1 | |
| 56 | <LOD | \leq NWG (1,3) | 1 | | | 1 | 1 | |
| 57 | <LOD | 1,4 | 1 | | | 1 | 1 | |
| 58 | 4,5 | 7,3 | 4 | | | 4 | 4 | 4 |
| 59 | 1,0 | 2,5 | 3 | | | 2 | 1 | 1 |
| 60 | <LOD | \leq NWG (1,3) | 1 | | | 1 | 1 | 1 |

Milchproben mit Ampicillin-Rückständen

| Lfd.Nr | Milchproben mit Ampicillin (HPLC) BfEL, Juni '03 Gehalt in µg/kg | Milchproben mit Ampicillin (MTP) Wuppertal '06 Gehalt in µg/kg | Delvo SP visuell betimmt | Delvo MCS visuell betimmt | Copan visuell betimmt | BRASsp visuell betimmt | BRT visuell betimmt | Beta star visuell betimmt |
|--------|--|--|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 1 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 2,4 | 0,93 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| 4 | 37,3 | 10,00 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 5 | 8,1 | 10,60 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 6 | 11,5 | 6,70 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 7 | 9,3 | 6,80 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| 8 | 6,3 | 3,50 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 |
| 9 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | 21,1 | ≥ obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 12 | 10,6 | 5,2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 13 | 5,7 | 5,2 | 4 | 4 | 3 | 4 | 2 | 4 |
| 14 | 6,0 | 2,4 | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 15 | 4,3 | 3,8 | 2 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 |
| 16 | 4,5 | 1,3 | 1 | leer | leer | 3 | 1 | 1 |
| 17 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 18 | <LOD | ≤ NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 19 | 26,0 | 2,5 | 1 | 4 | 2 | 4 | 3 | 2 |
| 20 | 8,3 | 2,4 | 1 | leer | leer | 3 | 2 | 1 |
| 21 | 4,5 | 2,7 | 1 | leer | leer | 1 | 1 | 1 |
| 22 | 3,5 | 1,6 | 1 | leer | leer | 1 | 1 | 1 |
| 23 | 2,9 | 2,1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 24 | 1,9 | 1,8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 25 | <LOD | 2,1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | <LOD | 2,0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 27 | 1,6 | 2,6 | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 | 2 |
| 28 | 18,1 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 29 | 5,4 | 2,5 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| 30 | 4,8 | 2,4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 31 | 2,7 | 2,4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 32 | 2,6 | 1,3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 33 | 1,7 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 34 | <LOD | < NWG | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 35 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 36 | <LOD | < NWG | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 37 | 14,5 | 5,4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 38 | 9,1 | 4,5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 39 | 3,9 | 3,1 | 2 | 4 | 2 | 4 | 3 | 2 |
| 40 | 3,5 | 3,0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 1 | 2 |
| 41 | 2,4 | 1,9 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 42 | 2,8 | 1,9 | 1 | 3 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| 43 | 1,9 | 1,9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 44 | 2,3 | 1,9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 45 | 1,6 | 1,8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 46 | 1,5 | 2,1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 47 | 1,3 | 2,3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 | <LOD | 2,8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Milchproben mit Cefoperazon-Rückständen

| Lfd.r | Milchproben mit Cefoperazon (HPLC) BfEL, Juni '03 Gehalt in µg/kg | Milchproben mit Cefoperazon (MTP) Wuppertal '06 Gehalt in µg/kg | Delvo SP visuell betimmt | Delvo MCS visuell betimmt | BRASsp visuell betimmt | BRT visuell betimmt | Beta star visuell betimmt |
|--------------|--|--|---|--|---------------------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 18,4 | 44 | 4 | 3 | 4 | 1 | 4 |
| 5 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 6 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 7 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 163,6 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 11 | 23 | 52 | 4 | 3 | 4 | 1 | 4 |
| 12 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 13 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 92,2 | 87 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 17 | 8,6 | 26 | 3 | 2 | 2 | 1 | 4 |
| 18 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 19 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 20 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 21 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 22 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 23 | 23,1 | 29 | 4 | 3 | 4 | 2 | 4 |
| 24 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 25 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 27 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 28 | 49,4 | 42 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 |
| 29 | (2,6) | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 30 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 31 | 3,9 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 32 | 48,9 | 51,0 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 |
| 33 | 6,7 | < NWG | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 34 | 12,4 | < NWG | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| 35 | 13,5 | < NWG | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 36 | 13,4 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 37 | 9,2 | < NWG | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 38 | 12 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 39 | 32 | < NWG | 3 | 2 | 1 | 1 | 4 |
| 40 | 6,7 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 41 | 9,9 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 42 | 4,8 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 43 | 4,3 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 44 | 65,2 | 39 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 45 | 6,8 | 34 | 3 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 46 | 5,8 | < NWG | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| 47 | <LOD | < NWG | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 48 | <LOD | < NWG | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 |

Fortsetzung Cefoperazon

| | | | | | | | |
|----|-------|-------------|---|---|---|---|---|
| 49 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 50 | 131,5 | 155 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 51 | 17 | < NWG | 1 | 2 | 1 | 2 | 4 |
| 52 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 54 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55 | 70 | 78 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 56 | 11 | < NWG | 3 | 3 | 2 | 2 | 4 |
| 57 | 9,6 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 58 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 59 | 1,9 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 60 | 5,2 | < NWG | 2 | 2 | 1 | 2 | 4 |
| 61 | 17 | 180* | 2 | 2 | 1 | 2 | 4 |
| 62 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 63 | 9,8 | > obere NWG | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 64 | 162 | > obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 65 | 25 | 31 | 2 | 1 | 1 | 2 | 4 |
| 66 | 18 | 89 | 1 | 4 | 4 | 2 | 4 |
| 67 | 5,8 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 68 | 17,7 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69 | 14,5 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 70 | 12,8 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 71 | 5,8 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 72 | 69 | 130 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 73 | 41,1 | 33 | 3 | 1 | 2 | 2 | 4 |
| 74 | 24,4 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 75 | 25,7 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 76 | 21,1 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 77 | 7 | < NWG | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 78 | 174 | ≥ obere NWG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 79 | 31 | 30 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| 80 | 13,1 | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

*Fehler bei der Probenanalyse; wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt

Milchproben mit Cefquinom-Rückständen

| Lfd.Nr | Milchproben mit Cefquinom (HPLC) BfEL, Juni '03, Gehalt in µg/kg | Milchproben mit Cefquinom (MTP) Wuppertal '06 Gehalt in µg/kg | Delvo SP visuell betimmt | BRASsp visuell betimmt | BRT visuell betimmt | Beta star visuell betimmt |
|---------------|---|--|---|---------------------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 2 | 23,9 | > NWG (~10) | 1 | 1 | 3 | 3 |
| 3 | 16,6 | > NWG | 1 | 1 | 3 | 3 |
| 4 | 4,8 | < NWG | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 5 | 59,4 | > NWG | 2 | 1 | 3 | 4 |
| 6 | 52,1 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 3 |
| 7 | 13,0 | 4,6 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 8 | 3,3 | 1,6 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 9 | 7,9 | 2,8 | 2 | 1 | 3 | 1 |
| 10 | 3 | 3,8 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 11 | 1,4 | 1,8 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 12 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 13 | 63,4 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 4 |
| 14 | 20,7 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 3 |
| 15 | 8,7 | 10 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 16 | <LOD | < NWG | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 93,9 | > NWG | 2 | 2 | 2 | 4 |
| 18 | 23,6 | > NWG | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 19 | 14,1 | 6,8 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 20 | 9,8 | 8 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 21 | 6,6 | 3,5 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 22 | 2,4 | 2,8 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 23 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 24 | 39,8 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 4 |
| 25 | 15,1 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 3 |
| 26 | 7,4 | 10 | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 27 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 28 | 48,7 | > NWG | 2 | 1 | 2 | 4 |
| 29 | 14 | 2,9 | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 30 | 10,2 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 3 |
| 31 | 6 | 4,5 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 32 | <LOD | < NWG | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 33 | 27 | > NWG | 2 | 1 | 3 | 3 |
| 34 | 37,3 | > NWG | 2 | 3 | 4 | 3 |
| 35 | 39,2 | > NWG | 2 | 3 | 4 | 3 |
| 36 | 8,4 | NWG / 10 | 2 | 2 | 4 | 1 |
| 37 | <LOD | < NWG | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 38 | 25,2 | > NWG | 2 | 3 | 4 | 3 |
| 39 | 11,3 | 2,9 | 2 | 3 | 4 | 3 |
| 40 | 4,7 | 1,4 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| 41 | 5,9 | 8,1 | 2 | 1 | 2 | 3 |
| 42 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 43 | 37,1 | > NWG | 1 | 1 | 2 | 4 |
| 44 | 11,6 | 2,9 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| 45 | 3,3 | 3,6 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 46 | 2 | 2,8 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 47 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 48 | 52,2 | > NWG | 1 | 2 | 3 | 4 |

Fortsetzung Cefquinom

| | | | | | | |
|-----|------|-------------|---|---|---|---|
| 49 | 20,6 | > NWG | 1 | 1 | 3 | 3 |
| 50 | 3,8 | 3,2 | 1 | 3 | 3 | 2 |
| 51 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 52 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53 | 56,0 | 8 | 2 | 1 | 1 | |
| 54 | 26,3 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 55 | 21,1 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 56 | 22,7 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 57 | 11,6 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 58 | 8,5 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 59 | 5,9 | > NWG (~10) | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 60 | 3,3 | 9,3 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 61 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 62 | 55,8 | > NWG | 3 | 1 | 1 | 4 |
| 63 | 44,8 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 64 | 26,1 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 65 | 21,2 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 66 | 13,1 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 67 | 13,9 | 2,3 | | | | 4 |
| 68 | 10,5 | > NWG | | | | 3 |
| 69 | 2,3 | 2,3 | | | | |
| 70 | 2,0 | 1,9 | | | | |
| 71 | 2,1 | 5,3 | | | | |
| 72 | 1,9 | 3,5 | | | | |
| 73 | <LOD | 1,4 / < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 74 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 75 | 75,8 | > NWG | 3 | 1 | 1 | 4 |
| 76 | 38,9 | > NWG | 2 | 1 | 1 | 4 |
| 77 | 22,0 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 78 | 16,4 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 79 | 14,2 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 80 | 3,1 | 3,7 | | | | |
| 81 | 2,4 | 4,6 | | | | |
| 82 | 2,1 | 3,2 | | | | |
| 83 | 2,3 | 3,6 | | | | |
| 84 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 85 | 53,9 | 7,2 | 2 | 1 | 1 | |
| 86 | 32,8 | > NWG | 2 | 1 | 1 | 4 |
| 87 | 23,3 | 4,5 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 88 | 25,2 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 89 | 11,8 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 90 | 2,0 | 4,2 | | | | |
| 91 | <LOD | 2,5 | | | | |
| 92 | <LOD | 3,5 | | | | |
| 93 | 2,0 | 2,7 | | | | |
| 94 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 95 | <LOD | < NWG | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 96 | 33,0 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 97 | 16,2 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 98 | 21,5 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 99 | 13,3 | > NWG | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 100 | 3,6 | < NWG | | | | |
| 101 | 2,1 | < NWG | | | | |

Gemessene pH-Werte des Tausaftes der unterschiedlichen Fleischsorten:

| Tausaft von... | Tausaftanteil | pH-Wert |
|-----------------------|----------------------|----------------|
| Rind | 100 % | 5,27 |
| | 80 % | 5,39 |
| | 40 % | 5,52 |
| | 10 % | 6,45 |
| Hirsch | 100 % | 5,22 |
| | 50 % | 5,33 |
| | 10 % | 6,18 |
| Schwein | 100 % | 5,56 |
| | 80 % | 5,62 |
| | 40 % | 5,86 |
| | 10 % | 6,42 |
| Pute | 100 % | 5,92 |
| | 10 % | 6,43 |