

# Zum immunchemischen Nachweis ausgewählter Sulfonamide in Milch

von A. Grether, P. Hammer und W. Heeschen  
Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchwirtschaft, Kiel

## 1. Einleitung

Sulfonamide finden auch heute noch vielfach Anwendung in der Behandlung laktierender Rinder. Sie zeichnen sich durch einen verhältnismäßig niedrigen Preis und ein breites Wirkungsspektrum aus.

Rückstände in der Milch sind im Hinblick auf die gesundheitliche Unbedenklichkeit, aber auch auf die technologische Weiterverarbeitungsfähigkeit der Milch von Interesse. Im folgenden wird im wesentlichen auf die rechtlichen Gesichtspunkte sowie auf Nachweisverfahren für Sulfonamidrückstände eingegangen.

Als Arzneimittel, die bei Tieren zur Lebensmittelgewinnung angewendet werden, unterliegen die Sulfonamide einer Wartezeitregelung (§23 Arzneimittelgesetz) (1). Die Wartezeit wird nach Untersuchungen an Labortieren anhand der Pharmakokinetik, des No Observable Effect Level (NOEL) und des Acceptable Daily Intake (ADI) festgelegt. Der ADI-Wert berechnet sich wie folgt (2):

$$\text{ADI (mg/kg KGW-Mensch)} = \frac{\text{NOEL (mg/kg KGW-Versuchstier)} \times \text{Körpergewicht (Mensch)}}{\text{Sicherheitsfaktor}}$$

Nach § 12 der Tierärztlichen Hausapothekenverordnung (TÄHAV) vom 31.5.1985 (3) muß der Tierarzt den Tierhalter auf die Wartezeit hinweisen.

Zur Herstellung wärmebehandelter Konsummilch darf nur Rohmilch verwendet werden, in der durch Untersuchungen entsprechend der Milch-Güte-Verordnung keine Hemmstoffe nachweisbar sind (Milch-Verordnung § 5 (2) 4) (4). Nach der Milch-Güte-VO (5) sind monatlich mindestens zwei Untersuchungen zur Feststellung von Hemmstoffen nach Anlage 5 durchzuführen (§ 23, Satz 2). Hiernach enthält eine Probe Hemmstoffe, wenn der Blättchentest mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* positiv ausfällt. Die Bezahlung nach Güte erfolgt ebenfalls nur, wenn Hemmstoffe nicht nachweisbar sind (§ 4 (3) 4 Milch-Güte-VO). Werden Hemmstoffe festgestellt, so wird in dem Monat je positives Ergebnis der Preis um 10 Pf./kg gekürzt (§ 4 (3)).

Nach Art. 15 (2) der EG-Richtlinie 92/46 (6) mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis muß die Milch auch auf Rückstände von Sulfonamiden untersucht werden. Überschreiten die Rückstände die zulässigen Grenzwerte, so ist die Milch vom Verzehr auszuschließen. Für diese Rückstandsuntersuchungen sind wissenschaftlich anerkannte und in der Praxis erprobte Verfahren zu verwenden, wie sie insbesondere auf Gemeinschaftsebene oder auf internationaler Ebene festgelegt sind. Anhang A, Kap. I, 4.b besagt, daß Milch von der Bearbeitung, Verarbeitung, dem Verkauf und Verbrauch ausgeschlossen ist, wenn sie die zulässigen Grenzwerte überschreitende Rückstände von Stoffen nach Art. 15 enthält. Nach Anhang A, Kap.I, 1.VII darf Milch nicht mit Stoffen be-

handelt worden sein, die eine Gefahr für die Verbrauchergesundheit darstellen oder darstellen könnten und in die Milch übergehen können, sofern die Milch nicht erst nach Ablauf einer amtlich festgelegten Wartezeit gewonnen wurde.

Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang die EWG-Verordnung 2377/90 sowie die Änderungsverordnung 675/92 (7) über die Feststellung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Die Höchstmengen werden hiernach erst festgelegt, wenn die Unbedenklichkeit der Rückstände für den Verbraucher und die Auswirkungen auf die industrielle Verarbeitung von Lebensmitteln festgestellt worden ist. Im Anhang III dieser VO gilt für die Summe aller Stoffe der Sulfonamidgruppe ohne Metaboliten eine MLR (Maximum Residue Limit) in Kuhmilch von 100 µg/kg. Die vorläufige MRL gilt bis zum 1.1.1994. Berechnet wird die MRL auf der Grundlage des ADI (2):

$$\text{MRL (mg/kg-Produkt)} = \frac{\text{ADI x kg Körpergewicht (Mensch)}}{\text{zusätzl. Sicherheitsfaktor x tägl. Verzehrsmenge}}$$

Damit haben die bisherigen Empfehlungen von Höchstmengen für Sulfonamide einen rechtlichen Rahmen erhalten.

Die bisher national zur Feststellung der Hemmstofffreiheit verwendeten Tests, z.B. mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim, können die nach EWG-VO 675/92 geforderten Höchstmengen nicht nachweisen. Diese Tests weisen Sulfonamide in Mengen von 500-1.000 µg/kg nach (8), häufig liegen diese Konzentrationen jedoch noch höher (9). Hierdurch kommt es zu einer Zweigleisigkeit in der deutschen Gesetzgebung. Da die Milchgüteverordnung auf Erzeugerebene nur Hemmstofffreiheit entsprechend dem *B.stearothermophilus*-Test fordert, könnte durchaus nach EG-Verordnungen nicht verkehrsfähige Milch zur Verarbeitung und in den Handel gelangen. Dies zu verhindern wäre Aufgabe der Molkereien, die im Rahmen der in der EG-Milchhygienerichtlinie definierten eigenverantwortlichen Sorgfaltspflicht (Art. 14) Untersuchungen auch zur Einhaltung der MRLs durchführen müßten. Dies ist in der Praxis jedoch noch kaum möglich, da weder eine ausreichende und alle Wirkungsspektren abdeckende Zahl von validierten Testsystemen auf dem Markt ist noch entsprechend geschultes Personal sowie Laborkapazität in den Molkereien vorhanden ist. Selbst die Überwachungsbehörden sind noch nicht auf dem Stand, größere Probenzahlen zur Kontrolle wiederum der Molkereien zu bewältigen.

Zum Sulfonamidnachweis sind eine Vielzahl mikrobiologischer (9, 10, 11, 12, 13) und chemisch-physikalischer Verfahren (14, 15, 16, 17, 18, 19) beschrieben sowie zahlreiche Ergebnisse mit dem mikrobiellen Rezeptortest (Charm Test II) (8, 9, 12, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26).

Der immunchemische Nachweis von Sulfonamiden wird mit unterschiedlich angeordneten ELISAs durchgeführt. Aufgrund des Haptencharakters der Sulfonamide unterliegt der Nachweis gewissen Einschränkungen. Ein Sandwich-ELISA im klassischen Sinne ist nicht durchführbar, da Haptene für eine Bindung sowohl an den Antikörper-Coat als auch gleichzeitig an ein Antikörper(AK)-Enzymkonjugat zu „klein“ sind. Grundsätzlich kommen daher nur zwei Varianten eines kompetitiven ELISAs in Frage (27):

### 1. Direkt kompetitiver ELISA

Bei diesem auch als „Antigen-Capture-Test“ bezeichneten Aufbau sind Antikörper an die Festphase gebunden. Nach Zugabe der Probe mit evtl. vorhandenen Antigenen wird ein zweites, enzymmarkiertes Antigen zugefügt, welches mit dem Probenantigen um die

Bindungsstellen am Coat konkurriert. Die nach dem Substratschritt gemessene Extinktion ist umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe.

## 2. Indirekt kompetitiver ELISA

Dieser ELISA wird im englischen Sprachgebrauch auch als „Antibody-Capture-Assay“ bezeichnet. Zu dem an die Festphase gebundenen Antigen wird die zu untersuchende Probe gegeben, welche zuvor mit einer definierten Menge spezifischer Antikörper inkubiert wurde. Durch Antigen in der Probe wird eine bestimmte Menge der zugesetzten Antikörper für eine Bindung an den immobilisierten Antigenen des Coats blockiert. Mit Hilfe eines entsprechenden Anti-Antikörper-Enzymkonjugats können die dennoch am Coat gebundenen Antikörper detektiert und quantifiziert werden. Auch hier ist die Extinktion umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration der Probe. Diese Form des ELISA hat den Vorteil, daß die oft schwierige Synthese eines Antigen-Enzymkonjugates nicht notwendig ist und daß die Kombination mehrerer Tests möglich ist.

Tab. 1 gibt einen Überblick über in der Literatur beschriebene ELISAs zum Sulfonamidnachweis, die alle nur den direkt kompetitiven Aufbau haben.

Aus dem Überblick der aufgeführten Nachweismethoden wird deutlich, daß im Sinne der EG-VO 675/92 einsetzbare Screening-Verfahren zur Detektion der Summe der Sulfonamide fehlen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Kombination von neu entwickelten Einzeltests auf Basis des Antiserum-Capture Tests (Monotests) einen sog. „Mischtest“ für die am häufigsten in der Veterinärmedizin angewendeten Sulfonamide Sulfadimidin (SDM), Sulfadimethoxin (SMX) und Sulfamerazin (SMZ) zu etablieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Die zur Testdurchführung verwendeten Substanzen werden tabellarisch aufgeführt, sofern nicht anders angegeben, sind sie zur Analyse geeignet (p.a.).

#### 2.1.1 Antiserumgewinnung und -prüfung

##### *Immunogenherstellung*

- Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma A 7888)
- Glutaraldehyd Grade I (25 %) (Sigma)
- Phosphatpuffer/Dioxan (Merck 9671)
- Dialysepuffer pH 7,4 s.u.

##### *Immunisierung*

- Albinokaninchen (Zika-Masthybriden), weibl., ca. 2,5 kg KGW; Privatzucht; je Sulfonamid 2 Tiere
- Immunogene: SDM-BSA-Konjugat, SMX-BSA-Konjugat, SMZ-BSA-Konjugat
- Freundesches Adjuvans, komplett (CFA) und inkomplett (IFA) (Difco)
- Alu Gel S (Serva)
- Kochsalzlösung (NaCl) : 0,9% NaCl (Merck) in A.dest.
- Ultraschallgerät (MSE; Mkz 150 w/20 kHz)

##### *Serumreinigung*

- Ammoniumsulfatlösung, gesättigt (SAS):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck) in A.dest.
- NaCl-Lsg. (s.o.)

Tab. 1: ELISAs zum Nachweis von Sulfonamiden

Charakteristika	Testform	Proben-substrat	Analyt	Nachweis-grenze µg/kg	Literatur
„CITE Sulfamethazine Testkit“, kommerziell; visuelle Auswertung, 6 min	direkt	Milch	SDM	10	(28)
Keine Angaben	direkt	Schweine-plasma	SDM	100	(29)
Immunogen: SDM-BSA Konjugat: SDM-HRPO Kreuzreaktionen mit SMZ 1,5 bis 2 h	direkt	Milch	SDM	1-1000	(30)
Immunogen: SDM-Thy-roglobulin Kreuzreaktionen: SMZ 30%; SMX 0,4%; CH <sub>3</sub> -SDM 138%; H-SDM 78%; Glykosyl-SDM 52%	direkt	Schweine-blut-extrakt	SDM und Metabolite	100	(31)
Immunogen: SDM-BSA Konjugat: SDM-HRP Kreuzreaktion: SMZ 30%	direkt	Milch	SDM SNA*	10 100	(32)
„LacTek Sulfamethazine Milk Screening Test“, kommerziell; 10 min	direkt	Milch	SDM	5 (photo-metrisch) 10(visuell)	(33)
„CITE Sulfa Trio Test Kit“ kommerziell; visuelle Auswertung; 6 min	direkt	Milch	SDM SMX Sulfathiazol	5 5 5	(28)
Charm Antibody Test; je-weils spezif. Antikörper; radioakt. Ag-Konjugat; 10 min	direkt	Milch	SDM SMZ SMX	0,5 5,0 10,0	(26)
Immunogen: SDM-HSA Konjugat: SDM-HRPO Kreuzreaktionen: SMZ 10 %, SMX 0-1%	direkt	Futter-mittel	SDM	70	(34)
Immunogen: SDM-HSA Konjugat: SDM-HRPO	direkt	Schweine-urin	SDM	200	(34)
Keine Angaben	keine Angabe	Gewebe Urin	SDM	25	(35)
Immunogen: SDM-BSA Konjugat: SDM-HRPO Kreuzreaktion: SMZ 56,14 % < 2,5 h	direkt	Milch	SDM	<10	(36)
Immunogen: SDM-BSA Konjugat: SDM-HRPO Kreuzreaktionen: SMZ 13,2 % SMX 0,1 %	direkt	Leber Muskel	SDM	100	(37)

\* SNA = Sulfanilamid

- Dialysepuffer = (PBS pH 7,4): 0,01 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 0,5 mol/l NaCl; 0,02%  $\text{NaN}_3$  (Merck)
- Dialysemembran: Dialysis Tubing-Visking, Size 1 - 8 / 32 (Medicell International Ltd., GB)

#### Antikörpernachweis

- Sorbens: Microtiterplatte Nunc-Immuno-Plate Maxisorp F 96 (Nunc)
- Greiner-Elisa Platte; KO; 96 K; F-Form; Bindungskapazität hoch
- Coatsubstanzen: SDM (Serva 35635: (2-[4-Aminobenzenesulfonamide]-4,6-dimethylpyrimidine) Natrium Salt)), SMX (Sigma S 7385: (4-Amino-N-[2,6-dimethoxy-4-pyrimidinyl]-benzenesulfonamide) Natrium Salt)), SMZ (Sigma S 9001: (4-Amino-N-[4-methyl-2-pyrimidinyl]-benzenesulfonamide) Natrium Salt))
- Absättigungsprotein: Ovalbumin, Grade III (Sigma 5378)
- Gereinigtes Antiserum (AS) bzw. Kaninchennormalserum (KNS) in gewünschter Konzentration in Verdünnungspuffer
- Enzymkonjugat: An Alkalische Phosphatase (AP) konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin (Ig) vom Schwein (DAKO GmbH, Code Nr. D 306; LOT Nr. 110)
- Substrat: 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (NPP) (Merck)
- Coatpuffer pH 9,6: 0,1 mol/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,02%  $\text{NaN}_3$
- Absättigungspuffer: 0,5% Ovalbumin in PBS-Verdünnungspuffer (PBS-Tween): 0,05 mmol/l Tween 20 (Merck-Schuchardt) in PBS pH 7,4 (s.o. Kap. 2.1.1)
- Substratpuffer pH 9,8: 0,05 mol/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,05 mol/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,001 mol/l  $\text{MgCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)
- Waschlösung: 0,5 mol/l NaCl Lsg.; 0,05 mmol/l Tween 20
- Mikrotiterplatten-Waschvorrichtung: Immunowash 8 (Nunc)
- Wasserbad (feuchte Kammer, 37 °C)
- ELISA-Reader EAR 400 AT (SLT-Labinstruments, Austria)

#### 2.1.2 Probenaufbereitung

- Hemmstofffreie Herdensammelgemelke von Rindern der Versuchsstation des Institutes für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung, Schädtk.
- Herdensammelgemelkproben von 197 Milcherzeugerbetrieben in Schleswig-Holstein (Probenentnahme Nov. 1991).
- Konsummilchproben (UHT-Milch), 252 Proben aus Europa (August 1992).
- Antibiotika und Chemotherapeutika

SDM, SMX, SMZ	s. o.	$\text{N}_4$ -Acetyl SMZ	(Serva 10560)
Sulfacetamid	(Serva 35630)	Amoxicillin	(Sigma A 8523)
Sulfadiazin	(Serva 35633)	Ampicillin	(Serva 13397)
Sulfadoxin	(Serva 35637)	Chloramphenicol	(Serva 16785)
Sulfaguanidin	(Serva 35640)	Dihydrostreptomycin	(Sigma D 7253)
Sulfamethizol	(Sigma S 5632)	Gentamicinsulfat	(Serva 22185)
Sulfamethoxy-pyridazin	(Serva 35654)	Oxytetracyclinhydrochlorid	(Sigma O 5875)
Sulfanilamid	(Serva 35670)	Penicillin G-Kalium	(Serva 31749)
Sulfathiazol	(Serva 35690)	Polymyxin-B-Sulfat	(Sigma P 1004)
Sulfmethoxazol	(Sigma S 7507)	Tetracyclinhydrochlorid	(Serva 35866)
$\text{N}_4$ -Acetyl SDM	(Serva 10558)	Trimethoprim	(Sigma T 7883)
$\text{N}_4$ -Acetyl SMX	(Serva 10557)		

- A. dest. steril
- Verdünnungspuffer (PBS-Puffer, pH 7,4; s. o.)
- Oxalsäure 4 %  $C_2H_2O_4 \times 2 H_2O$  (Merck) in A. dest. steril
- NaOH 1 mol/l
- HCL (Merck 9057)
- Essigsäure 5 %
- A.dest.-Tween: 2,1 mmol/l Tween 20 (Merck-Schuchardt) in sterilem A. dest
- Schüttler, KS 10 (Laborgeräte Edmund Bühler, Tübingen)

### 2.1.3 Nachweis der Sulfonamide

- Antiserumverdünnung: Antiserum in gewünschter Konzentration in Verdünnungspuffer
- Proben: Pufferproben; aufbereitete Milchproben
- Zylindergläser, flacher Boden, 11 mm Durchmesser; 55 mm Höhe
- sonstige Materialien s. Antikörpernachweis

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Antiserumgewinnung und -prüfung

#### *Immunogenherstellung*

Sulfonamide sind aufgrund ihrer Eigenschaft als Haptene nicht immunogen.

Für die jeweiligen Sulfonamide SDM, SMX und SMZ wurde nach der von DIXON-HOLLAND und KATZ (30) beschriebenen Methode selbst ein Immunogen synthetisiert, hierzu wird im sog. „One-Step-Verfahren“ (38) bovines Serumalbumin (BSA) über Glutaraldehyd an das jeweilige Sulfonamid gekoppelt:

1. 350 mg SDM oder SMX oder SMZ und 600 mg BSA in 75 ml Phosphatpuffer/ Dioxan (2 + 1) lösen,
2. 0,35 ml Glutaraldehyd (25 %) zufügen,
3. 3 Stunden vermischen (Rundschüttler, 150 U/min)
4. 6 Tage gegen Dialysepuffer pH 7,4 mit 2 Pufferwechseln pro Tag (Dialyseschlauch 2 ml/cm) dialysieren,
5. Immunogen lyophilisieren,
6. Lyophilisat bei -20°C im Exsikkator aufbewahren.

#### *Immunisierung*

10 mg des Lyophilisats werden in 10 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung gelöst (1 mg/ml). Um die Vakzine herzustellen, werden unterschiedliche Mengen an Immunogen (s.u.), NaCl-Lsg., Alugel sowie entweder CFA oder IFA zusammengegeben. Dieses Gemisch wird mind. 1 Stunde bei 4 °C belassen, um eine Adsorption des Alugels an das Immunogen zu erreichen; im Anschluß daran wird die Vakzine 10 Sekunden mit Ultraschall homogenisiert.

Die Applikation der Vakzine erfolgt entweder subkutan (s.c.) im Genick oder intradermal (i.d.) mit max. 10-14 Plaques am Rücken beidseitig der Wirbelsäule.

Grundimmunisierung: über 6 Wochen

- |          |   |      |
|----------|---|------|
| 1. Woche | 50 µg Immunogen + 0,95 ml NaCl + 0,5 ml Alugel + 0,5 ml CFA | i.d. |
| 2. Woche | 100 µg Immunogen + 0,9 ml NaCl + 0,5 ml Alugel + 0,5 ml IFA | i.d. |
| 3. Woche | 200 µg Immunogen + 0,8 ml NaCl + 0,5 ml Alugel + 0,5 ml IFA | s.c. |
| 4. Woche | 400 µg Immunogen + 0,6 ml NaCl + 0,5 ml Alugel + 0,5 ml IFA | i.d. |
| 5. Woche | 500 µg Immunogen + 0,5 ml NaCl + 0,5 ml Alugel + 0,5 ml IFA | s.c. |
| 6. Woche | 500 µg Immunogen + 0,5 ml NaCl + 0,5 ml Alugel + 0,5 ml IFA | i.d. |

Im Anschluß an die Grundimmunisierung werden die Kaninchen mit der letzten Vakzine bei Bedarf geboostert (Intervalle jedoch nicht kleiner als 6 Wochen).

Die Blutentnahme (ca. 50 ml/Tier) erfolgt durch Punktion der *A. auricularis media* jeweils 10 Tage nach Abschluß der Grundimmunisierung bzw. den Boosterungen.

### Serumreinigung

Die Reinigung der gewonnenen Kaninchenserum, d.h. die Extraktion der Immunglobuline, erfolgt durch Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (SAS) (39). Es wird nach folgendem Schema vorgegangen:

1. Tropfenweise Zugabe von SAS zu Serum (1:3) unter ständigem Rühren (1/3 Sättigung); entweder über Nacht oder 3 Stunden bei 4 °C rühren; anschließend zentrifugieren (10 min bei 2200 g) und dekantieren; Sediment in steriler NaCl-Lsg. (entsprechend ursprünglich eingesetztem Serumvolumen) aufnehmen und lösen, zweimal wiederholen (jeweils 30 min bei 4 °C rühren).
2. Sediment nach der 3. Fällung in 1-2 ml PBS Puffer pH 7,4 lösen.
3. Dialyse gegen PBS Puffer pH 7,4 bei 4 °C über Nacht.
4. Zentrifugieren 10 min bei 2200 g.
5. Überstand portionieren à 100 µl in Eppendorfcups, bei -18 °C lagern.

### Antikörpernachweis

Die Titerbestimmung erfolgt mit einem ELISA. Pro Verdünnungsstufe werden 3 Kavitäten der Mikrotiterplatte beschickt, alle Inkubationsschritte finden in einer feuchten Kammer bei 37 °C statt (Wasserbad).

Alle Puffer sowie die Waschlösung werden bei Raumtemperatur eingesetzt.

1. Coat: SDM oder SMX oder SMZ 10 mg Substanz lösen mit 100 µl 1M NaOH; verdünnen mit Coatpuffer; Endkonzentration 1 mg/ml; 100 µl/Kavität; über Nacht
2. Waschen: nach jedem Reaktionsschritt, 3 mal mit Waschlösung
3. Absättigung: Absättigungspuffer; 300 µl/Kavität; 45 min
4. Antiserum: Verdünnung wie folgt: 1:500/1000/5000/10.000/50.000/100.000/500.000/-1 Mio. 100 µl/Kavität; 90 min
5. Konjugat: Enzymkonjugat; 1:1000 in Verdünnungspuffer 100 µl Kavität; 90 min
6. Substrat: NPP; 1 mg/ml Substratpuffer; 150 µl/Kavität; 30 min
7. Messung: automatisch mit Hilfe des ELISA-Reader EAR 400 AT (SLT) Bestimmung der Optischen Dichte (O.D.) bei 405 nm

## 2.2.2 Probenaufbereitung

– Entfettete Milch

1. Entfettung: 10 ml möglichst kühle Milch zentrifugieren (10 min bei 2200 g); Rahmschicht mit einem Holzstäbchen entfernen

– Oxalsäureaufbereitung (40)

1. Entfettung: s. o.

2. Proteinfällung: Zugabe von 556 µl Oxalsäure 4%ig zu 5 ml entfetteter Milch in 25 ml Erlenmeyerkölbchen; 10 min bei Raumtemperatur abgedeckt schwenken (Rundschüttler 150 U/min); Überstand dekantieren und zentrifugieren (10 min bei 2200 g); Reste von Fett mit Pasteurpipette absaugen; 2 ml klaren Überstand als Probe verwenden; Zugabe von jeweils 60 µl 1M NaOH und 50 µl A.dest.-Tween zu 2 ml Probe

Lagerung: je 350 µl in Eppendorfcups bei -18°C lagern bzw. über Nacht auch bei Kühlschranktemperatur (4°C)

## 2.2.3 Nachweis der Sulfonamide

### *Herstellung von Puffer- und Milchstandards*

– *Herstellung von Stocklösungen*

SDM oder SMX oder SMZ: 10 mg Substanz in 100 µl 1M NaOH lösen, anschließend ad 10 ml mit sterilem A.dest. verdünnen, ebenso die übrigen Sulfonamide s. Kap. 2.1.2.

Ausnahmen:

Sulfaguanidin: 10 mg mit 100 µl HCL lösen ad 10 ml A. dest. steril.

Trimethoprim: 10 mg + 1 ml 5% Essigsäure ad 10 ml A. dest. steril.

Chloramphenicol: 100 mg/10 ml Methanol 50 % ad 100 ml A. dest. steril.

Die übrigen Antibiotika lösen sich direkt in sterilem A. dest.

- *Herstellung der Standards*

Verdünnung der Stocklösungen in PBS-Tween (Pufferstandard) oder in hemmstofffreier Milch in Endkonzentrationen von 0-100 µg/kg.

Die Pufferproben können direkt im ELISA eingesetzt werden, die Milchproben müssen nach Kap. 2.2.2 aufbereitet werden.

### *Kompetitiver ELISA zum Nachweis von SDM, SMX und SMZ*

Mit folgendem Testaufbau können die drei Sulfonamide entsprechend dem eingesetzten Antiserum sowohl als Einzelsubstanz (Monotest) bzw. bei Verwendung eines Antiserum-Gemisches auch gemeinsam nachgewiesen werden (Mischtest).

1. Coat: s. Kap. Antikörpernachweis, bzw. 1 mg/ml SDM + 1 mg/ml SMX + 1 mg/ml SMZ

2. Waschen: s. Kap. Antikörpernachweis

3. Absättigung: s. Kap. Antikörpernachweis

4. Probenneutralisation:

a) Auftauen der tiefgefrorenen Proben ca. 15 min bei 37 °C im Brutschrank

b) 300 µl Probe im Zylinderglas mit 50 µl Antiserum-Vorverdünnung (Rundschüttler, 350 U/min) 60 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubieren

Antiserum-Endkonzentrationen SDM 1 : 2000, SMX 1 : 2000, SMZ 1 : 5000,

5. Probe: neutralisierte Probe; 100 µl/Kavität; 90 min



- 6. Konjugat: s. Kap. Antikörpernachweis
- 7. Substrat: NPP 1 mg/ml; 150 µl/Kavität ; 60 min
- 8. Ablesen: s. Kap. Antikörpernachweis

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Antiserumgewinnung und -prüfung

##### *Antiserumtiter*

Durch die Vakzinierung der Kaninchen mit dem selbst hergestellten Immunogen konnten polyklonale Antiseren gegen SDM, SMX sowie SMZ gewonnen werden. Die Bestimmung erfolgt nach dem beschriebenen ELISA, wobei die erhaltenen O.D.-Werte (= optische Dichte) direkt proportional zur Antikörperkonzentration sind. Der Antikörpertiter stellt diejenige Verdünnung dar, in der noch eine spezifische Reaktion im Vergleich zum Anamneseserum nachweisbar ist. Alle Tiere erreichten bereits nach der Grundimmunisierung gegen die drei Antigene Titer von jeweils ca. 1:50.000.

#### 3.2 Testentwicklung

##### *Kompetitiver Antibody-Capture Test*

Für den Testaufbau wurde der kompetitive Antibody-Capture ELISA gewählt, da hierfür die Synthese eines Antikörper-Enzym-Konjugates nicht nötig und die Durchführung relativ einfach ist (Abb. 1).

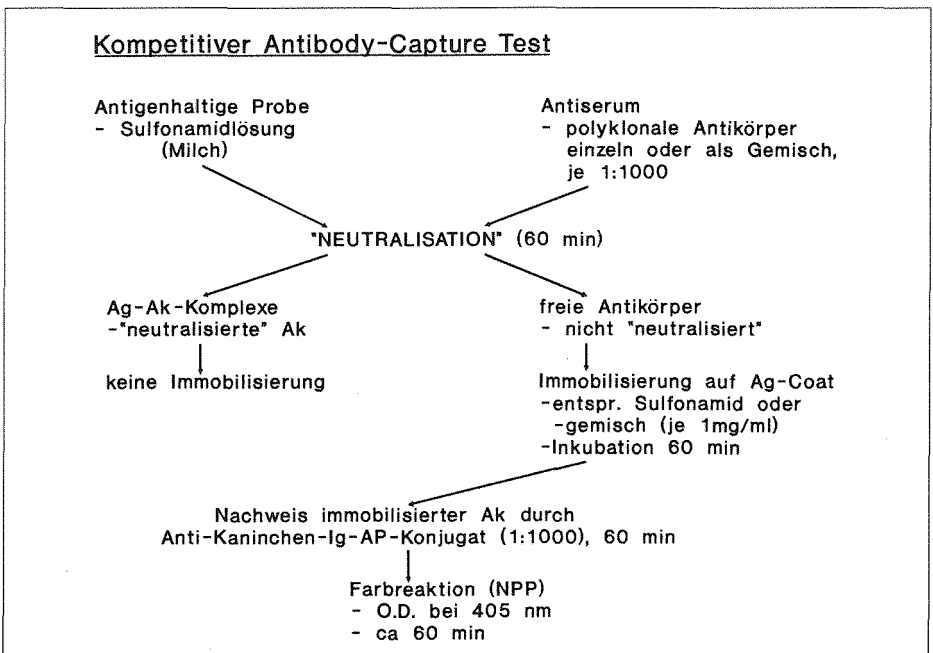


Abb. 1: Aufbau des kompetitiven Antibody-Capture Tests

Die Konzentration der verschiedenen Antigencoats konnte von dem ELISA zum Antikörpernachweis übernommen werden (1 mg/ml). Die anderen Testparameter wie Verdünnung des Enzymkonjugates, Inkubationszeit und -temperatur sowie die jeweilige Antiserumkonzentration wurde durch sog. „Schachbrettversuche“ aufeinander abgestimmt.

– *Auswertung*

Allen nachfolgend beschriebenen Tests ist der Auswertungsmodus gemeinsam. Photometrisch werden die absoluten O.D.-Werte ermittelt, wobei sich diese umgekehrt proportional zu den in der Probe vorhandenen Konzentrationen des gewünschten Antigens verhalten. Die O.D.-Werte werden als arithmetisches Mittel aus drei Meßwerten berechnet. Bei jedem Testansatz werden eine Standardreihe sowie mindestens 5 „Null-Proben“ mitgeführt. Der ELISA unterliegt naturgemäß jedoch tagesabhängigen Schwankungen, die auf eine Vielzahl von Faktoren zurückzuführen sind. Aus diesem Grund hat es sich bei der Probenbeurteilung als sinnvoll erwiesen, die relativen O.D.-Werte heranzuziehen, da hiermit der Einfluß eventueller tagesbedingter Schwankungen vermieden werden kann. Die relativen O.D.-Werte errechnen sich nach folgendem Prinzip: Das arithmetische Mittel der 5 Null-Proben wird gleich 100% gesetzt. Folgende Formel findet sodann Anwendung:

$$\% \text{ O.D. der Probe} = \frac{\text{absoluter O.D.-Wert der Probe}}{x_A \text{ absoluter O.D.-Wert der Null-Proben}} \times 100$$

*Probenaufbereitung*

Die Übertragung des Testmodells, welches für Standardreihen in Pufferlösungen entwickelt wurde, auf Milch setzt voraus, daß die Milch wiederholbar einheitlich aufbereitet werden kann. Ziel hierbei ist, alle ein empfindliches Testsystem störenden Einflüsse wie z.B. schwankende Zusammensetzung (Fett, Eiweiß, Zellzahlen) auszuschalten. Hierzu wurden zwei im hiesigen Institut angewendete Aufbereitungsmethoden verglichen.

– *Entfettete Milch*

Als einfachste Form wurde Milch nur entfettet eingesetzt. In Tab. 2 sind die Ergebnisse für die jeweiligen Monosubstanzen im Hinblick auf die Wiederholbarkeit des ELISAs dargestellt.

Tab. 2: Wiederholbarkeit von Probenaufbereitung und ELISA; je 6 getrennt aufbereitete Standardreihen, entfettete Milch

Konzentration µg/kg	SDM-ELISA		SMX-ELISA		SMZ-ELISA	
	X <sub>A</sub> % O.D.	VK %	X <sub>A</sub> % O.D.	VK %	X <sub>A</sub> % O.D.	VK %
100	3,07	34,7	2,21	8,6	11,50	38,2
50	3,42	19,3	2,78	25,6	17,12	31,2
25	5,40	8,9	4,50	5,1	24,39	12,4
12,5	7,94	12,7	6,60	17,1	39,46	11,7
6,25	18,33	7,7	12,96	7,1	65,17	16,5
0	100	–	100	–	100	–

Es zeigt sich, daß mit nur entfetteter Milch zwar eine sehr gute positiv-negativ Klassifizierung, eine Quantifizierung jedoch mit vertretbarem Serumverbrauch nicht möglich ist. In Schachbrettversuchen wurde eine Quantifizierung erst ab einer Serumverdünnung unter 1:100 möglich (Ergebnisse nicht gezeigt). Zu beachten sind auch die mit ca. 0,4 relativ niedrigen O.D.-Werte der Null-Probe (Tab. 3).

Tab. 3: Vergleich des Einflusses einer Proteinfällung mit Oxalsäure bei entfetteter Milch und ohne Proteinfällung auf das Ergebnis im ELISA am Beispiel von SDM-Standardreihen

Konzentration µg/kg	nur entfettet		Oxalsäure-Fällung	
	% O.D.	O.D.	% O.D.	O.D.
100	3,07	0,014	5,79	0,137
50	3,42	0,016	8,54	0,202
25	5,40	0,026	14,42	0,341
12,5	7,94	0,038	46,26	1,094
6,25	18,33	0,087	49,98	1,182
0	100	0,475	100	2,379

#### – Oxalsäure-Aufbereitung

Weiterhin wurde die Milch entfettet und die Proteine in Anlehnung an die Arbeit von Kirchhoff (40) mit Oxalsäure 4%ig gefällt (Tab. 3). Diese Aufbereitung führt in der Regel zu klaren Proben. Trübe Proben, die z.B. durch zu hohen Fettgehalt der Milch bzw. pH-Wert-Abweichungen vorkommen können, führen im ELISA zu falschpositiven Resultaten.

Für die ELISAs der Einzelsubstanzen wird sowohl eine qualitative, wie auch quantitative Klassifizierung der Proben gefordert, so daß die hierfür geeignete Methode die Oxalsäure-Aufbereitung darstellt. Durch die sehr hohen und gut abgestuften O.D.-Werte ist ein breiter Meßbereich vorhanden, der u.a. die sichere Quantifizierung der Proben erlaubt. Dieses wäre im Hinblick auf die eventuelle Etablierung einer immunchemischen Konfirmationsmethode von großer Bedeutung.

Die einfachere Methode, die Milchproben nur zu entfetten, eignet sich hingegen sehr gut als Screening-Verfahren zur rein qualitativen Probenbeurteilung.

### 3.3 Monotests zum Nachweis von SDM, SMX und SMZ

Im Hinblick auf die gewünschte Quantifizierung, die nur mit Proben aus einer Oxalsäure-Aufbereitung möglich ist, werden bei den Monotests für die Einzelsubstanzen nur Versuche mit entsprechenden Proben dargestellt.

#### Nachweisgrenze

Nach der Kommission der Europäischen Gemeinschaften (41) wird als Nachweisgrenze der unterste Meßwert definiert, aus dem mit hinreichender statistischer Sicherheit auf die Anwesenheit des Analyten geschlossen werden kann. Sie entspricht der Summe des mittleren Meßwertes der repräsentativen Blindproben und der dreifachen Standardabweichung des Mittelwertes.

Im ELISA werden die untersuchten Proben durch den Vergleich der Meßwerte bzw. der errechneten % O.D.-Werte mit denen des mitgeführten Standards ausgewertet. Hierbei ist wichtig, daß eine Unterscheidung zwischen positiven, d.h. Sulfonamid-haltigen, und negativen, d.h. Sulfonamid-freien Proben sicher vorgenommen werden kann (Tab. 4). Die eigentliche qualitative Nachweisgrenze kann noch unter diesem hier definierten Meßwert liegen.

$$sm = \text{mittlere Standardabweichung} = \sqrt{\frac{\sum (s^2)}{n}}$$

Tab. 4: Definition der Nachweisgrenze für Sulfadimidin (SDM), Sulfadimethoxin (SMX) und Sulfamerazin (SMZ) mit Hilfe der dreifachen mittleren Standardabweichung (alle Werte % O.D.)

Konzentration µg/kg	SDM			SMX			SMZ		
	X <sub>A</sub>	+ 3 sm	- 3 sm	X <sub>A</sub>	+ 3 sm	- 3 sm	X <sub>A</sub>	+ 3 sm	- 3 sm
50	10,1	21,24	- 1,04	19,10	29,22	8,98	36,24	45,61	26,90
25	22,9	34,04	11,76	27,02	37,14	16,90	53,44	62,81	44,07
12,5	35,8	46,94	24,66	41,01	51,14	30,80	68,79	78,10	59,47
6,25	50,7	61,84	39,56	56,80	66,92	46,68	84,84	94,21	75,47
0	100	111,4	88,6	100	110,12	89,88	100	109,37	90,63

Es zeigt sich, daß bei Verwendung der dreifachen mittleren Standardabweichung zur qualitativen Unterscheidung positiver und negativer Proben ein hinreichend großer Meßabstand zwischen der letzten „positiven“ und der negativen Probe liegt. Proben mit geringeren Sulfonamid-Konzentrationen sollen als negativ gelten, da im Hinblick auf die EG-Verordnung 675/92 eine noch höhere Empfindlichkeit des Testsystems nicht notwendig ist.

**Wiederholbarkeit**

Nach der Kommission der Europäischen Gemeinschaften (41) wird die Wiederholbarkeit als Maß der Übereinstimmung zwischen aufeinanderfolgenden Ergebnissen definiert, die mit demselben und identischen Testmaterial unter denselben Bedingungen erzielt wurden. Als Maß für die Wiederholbarkeit gilt der Variationskoeffizient (VK).

Zur Überprüfung wurde eine Rohmilchprobe gesplittet und daraus Standardreihen getrennt voneinander aufbereitet. Diese wurden an einem Tag im ELISA getestet, die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt.

Zu beachten ist, daß die O.D.-Werte für höhere Sulfonamid-Konzentrationen sehr niedrig sind (nicht gezeigt), ebenso die entsprechenden % O.D.-Werte. Vergleichsweise geringe Streuungen wirken sich hierdurch in einem relativ hohen Variationskoeffizienten aus, der daher in diesen Fällen nicht überbewertet werden darf.

Durch die beschriebene Testanordnung wurde das gesamte Verfahren, d.h. die Wiederholbarkeit der Probenaufbereitung und die des ELISAs überprüft.

Tab. 5: Wiederholbarkeit von Probenaufbereitung und ELISA zum Nachweis von Sulfadimidin (SDM), Sulfadimethoxin (SMX) und Sulfamerazin (SMZ), 6 getrennt aufbereitete Standardreihen (alle Werte % O.D.)

Konzentration µg/kg	SDM		SMX		SMZ	
	X <sub>A</sub>	VK	X <sub>A</sub>	VK	X <sub>A</sub>	VK
50	10,1	27,7	19,10	18,24	36,24	5,14
25	22,9	15,9	27,02	14,23	53,44	7,67
12,5	35,8	15,0	41,01	7,93	68,79	4,85
6,25	50,7	4,5	56,80	5,00	84,84	3,30
0			100	-	100	-

**Spezifität**

Als Spezifität wird die Eignung einer Methode zur Unterscheidung zwischen dem gesuchten Analyten und anderen Stoffen definiert (41). Der ELISA zeichnet sich grundsätzlich aufgrund der Natur der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen durch eine hohe

Spezifität aus. Da es sich bei den gewonnenen Seren jedoch um polyklonale Antisera handelt, muß der Test im Hinblick auf bestehende Kreuzreaktionen mit anderen Sulfonamiden und Antibiotika überprüft werden. Die verwendete Rohmilch wurde in Konzentrationen von 1000, 100 und 10 µg/kg mit den in Kap. 2.1.2 angeführten Hemmstoffen versetzt. Tab. 6 zeigt die entsprechenden Sulfonamide und die evtl. kreuzreagierenden Substanzen nur in der Verdünnung, bei der eine Reaktion meßbar war. Anhand der Eichkurven werden die Sulfonamid-Äquivalente ermittelt, die den Verdünnungsstufen der kreuzreagierenden Substanzen entsprechen. Bei den nicht aufgeführten Antibiotika bzw. Chemotherapeutika bestand keine nennenswerte Kreuzreaktion.

Tab. 6: Kreuzreaktionen im Sulfadimidin- (SDM), Sulfadimethoxin- (SMX) und Sulfamerazin- (SMZ) Monotest mit anderen Sulfonamiden und Chemotherapeutika

	Konz. µg/kg	% O.D.	kreuzreag. Substanz	Konz. µg/kg	% O.D.	Äquivalent SDM ca. µg/kg	
SDM	1000	1,27	Sulfadimethoxin	1000	66,60	6,0	
	100	5,50	Sulfamerazin	1000	19,80	64,0	
	10	42,05		100	57,60	7,6	
	0	100,0		10	85,13	2,7	
			Sulfanilamid	100	88,54	2,1	
			Ampicillin	1000	80,00	3,7	
SMX	1000	1,2	Sulfamethizol	100	75,3	6,6	
	100	10,4	Ampicillin	1000	62,9	9,5	
	10	60,7		100	97,1	0,9	
	0	100					
SMZ	1000	2,1	Sulfadimidin	1000	15,9	17,8	
	100	8,4		100	53,2	8,5	
	10	44,7		10	90,5	1,7	
	0	100	Sulfadiazin	100	39,1	11,6	
				10	88,7	2,1	
			Sulfanilamid	100	83,3	3,2	
			Ampicillin	1000	78,9	3,8	
			Penicillin G	1000	70,9	5,4	
	Äquivalent SMZ, SMX und SMZ graphisch anhand der Eichkurve ermittelt						

Weiterhin muß der mögliche Einfluß strukturell ähnlicher Metaboliten des gesuchten Analyten auf das Testsystem geprüft werden. Die N<sub>4</sub>-Acetyl-Metaboliten sind hier die einzigen im Handel erhältlichen, so daß weitere, wie z.B. 5-Hydroxy-Sulfadimidin, nicht untersucht werden konnten. Die N<sub>4</sub>-Acetyl-Metaboliten der Substanzen Sulfadimidin, Sulfadimethoxin und Sulfamerazin wurden in Konzentrationen von 100 bis 0 µg/kg in Milch aufbereitet und mit dem entsprechenden homologen Standard verglichen (Tab. 7).

Es wird deutlich, daß die homologen N<sub>4</sub>-Acetyl-Metaboliten praktisch im gleichen Maße wie die Muttersubstanzen reagieren. Auch die Kreuzreaktionen zwischen Sulfadimidin und -merazin mit den jeweils anderen Metaboliten sind zu beachten.

Desweiteren wurde auch *p*-Aminobenzoesäure (PABA) als strukturell sehr ähnlicher, kompetitiver Antagonist in den Monotests auf Kreuzreaktion geprüft. PABA-Konzentrationen von 10, 100, 10.000 sowie 100.000 µg/kg zeigten keinen Einfluß auf die Tests (Ergebnisse nicht gezeit).

Tab. 7: Kreuzreaktionen im Sulfadimidin-(SDM), Sulfamethoxin-(SMX) und Sulfamerazin-(SMZ)-Monotest mit den jeweiligen N<sub>4</sub>-Acetyl-Metaboliten

Konz. µg/kg	SDM-Standard % O.D.	N <sub>4</sub> -Acetyl-SDM		N <sub>4</sub> -Acetyl-SMZ		N <sub>4</sub> -Acetyl-SMX	
		% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg	% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg	% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg
100	-	3,5	65,2	28,2	10,9	93,3	0
50	5,2	6,9	42,4	40,3	8,1	91,5	0
25	11,3	13,1	22,8	43,6	7,1	92,8	0
12,5	21,6	19,5	14,7	57,2	5,2	92,4	0
6,25	47,9	26,6	11,4	68,6	3,8	92,0	0
Konz. µg/kg	SMX-Standard % O.D.	N <sub>4</sub> -Acetyl-SMX		N <sub>4</sub> -Acetyl-SDM		N <sub>4</sub> -Acetyl-SMZ	
		% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg	% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg	% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg
100	-	15,8	71,0	82,2	9,0	89,1	4,1
50	29,4	28,0	52,0	83,7	7,0	94,9	2,1
25	45,4	58,6	19,0	87,5	4,6	96,0	2,0
12,5	79,7	80,5	10,2	90,8	3,6	90,1	3,8
6,5	84,4	93,7	2,5	79,7	12,5	94,1	2,2
Konz. µg/kg	SMZ-Standard % O.D.	N <sub>4</sub> -Acetyl-SMZ		N <sub>4</sub> -Acetyl-SDM		N <sub>4</sub> -Acetyl-SMX	
		% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg	% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg	% O.D.	Äquival. SMZ ca. µg/kg
100	-	23,5	61,8	70,0	8,2	98,6	0,4
50	31,0	33,6	45,4	76,1	6,8	97,9	0,6
25	45,7	50,3	20,7	82,5	5,0	100,1	<0*
12,5	58,6	61,7	11,6	88,7	3,1	97,3	0,9
6,25	79,8	78,1	6,7	89,5	2,7	101,9	<0*

Äquivalent SDM, SMX und SMZ graphisch an Hand der Eichkurve ermittelt  
 \* Meßwert höher als beim Nullwert der Standardprobe

### 3.4 Mischtest

In Vorversuchen zur Entwicklung der Monotests zeigte sich, daß Antikörper gegen Sulfanilamid in seiner Eigenschaft als Grundgerüst nicht als Basis für einen Screeningtest verwendet werden konnten. So wurde versucht, die drei entwickelten Monotests zu kombinieren.

#### Vorversuche

In diesen Versuchen sollte die Frage geklärt werden, ob – und wenn, in welchen Konzentrationen – sich die Komponenten der Tests mischen lassen. Hierzu wurden mit Oxalsäure aufbereitete Milchproben verwendet, da mit diesen die Empfindlichkeit des Testsystems größer ist und somit eine bessere Aussage über die Eignung möglicher Kombinationen zu treffen ist. Besonders zu berücksichtigen für den Testaufbau waren hierbei die Konzentrationen für den Antigencoat und die Antiserumverdünnungen. Es wurde für jedes Sulfonamid nach Schachbrettmuster folgende Versuchsanordnung, deren Ergebnisse hier beispielhaft für SDM dargestellt sind (Tab. 8), überprüft:

Als Bezugsgröße wurde ein SDM-Monotest nach bekannter Anordnung durchgeführt (Komb. A). Die Funktionsfähigkeit des Mischcoates (alle drei Sulfonamide je 1 mg/ml)

wurde mittels SDM-Probe und -Antiserum überprüft (Komb. B), die Eignung von Mischproben (alle drei Sulfonamide gleiche Konzentration pro angegebener Verdünnungsstufe) und Misch-Antiserum (hier Anti-SDM 1:2000, Anti-SMX 1:2000, Anti-SMZ 1:5000) anhand eines Tests mit einem SDM-Mono-Coat (Komb. C). Abschließend sollte betrachtet werden, inwiefern die Kombination von Mischcoat, Mischprobe und Mischantiserum zu auswertbaren Ergebnissen führt (Komb. D).

Tab. 8: Mischtestentwicklung, mögliche Kombinationen aller Komponenten, dargestellt am Nachweis von Sulfadimidin (SDM)

Kombination		Konz. µg/kg, Angabe von O.D. und % O.D. ( )				
		50	25	12,5	6,25	0
A	SDM-Coat SDM-Probe SDM-As*	0,226 (19,6)	0,341 (29,6)	0,533 (46,3)	0,788 (68,4)	1,152
B	Misch-Coat SDM-Probe SDM-As	0,120 (12,3)	0,213 (21,9)	0,338 (34,7)	0,600 (61,7)	0,973
C	SDM-Coat Misch-Probe Misch-As	0,403 (31,6)	0,539 (42,3)	0,768 (60,3)	0,885 (69,4)	1,274
D	Misch-Coat Misch-Probe Misch-As	0,437 (29,1)	0,630 (41,8)	0,803 (53,4)	1,071 (71,2)	1,504

\* As = Antiserum

Nach diesen Resultaten ist es bei allen Testanordnungen möglich, zwischen positiven und negativen Proben zu unterscheiden.

### Auswertung

Die Auswertung erfolgt prinzipiell wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Mitführung jeweils einer Standardreihe der Monosubstanz oder eines Mischstandards erscheint nicht sinnvoll, da in einer unbekanntem Probe naturgemäß nichts über den Gehalt, die Kombination und die Konzentration eventueller Sulfonamide bekannt ist. Aus diesem Grunde werden stattdessen 5 Null-Proben mitgeführt und als sog. „Null-Standard“ gemittelt.

### Nachweis von SDM, SMX und SMZ einzeln und in Kombination

#### – Entfettete Milch

Als besonders interessant für den Mischtest als geplantes einfaches Screening-Verfahren muß die Verwendung nur entfetteter Milchproben betrachtet werden. Die Antiserumkombination besteht hier aus Verdünnungen von je 1:1000 pro Komponente. Mit diesem Testaufbau ist ein sicherer Nachweis von Einzelsubstanzen und Substanzkombinationen ab 25 µg/kg möglich (Tab. 9).

Sulfonamid-Kombinationen wurden hier in Konzentrationen so hergestellt, daß sie in der Summe der jeweils angegebenen Konzentrationenstufe entsprechen. Die Kombinationen führen zu deutlich erniedrigten % O.D.-Werten. Beträgt die Summe der Konzentrationen SMX und SMZ beispielsweise 50 mg/kg, so ist die Reduktion der O.D. sogar stärker, als dies der jeweiligen Konzentration der Monosubstanz entspräche.

#### – Oxalsäure-Aufbereitung

Bei einer Serumkombination von Anti-SDM 1:2000, Anti-SMX 1:500 und Anti-SMZ 1:5000 lassen sich auch hier die 3 Substanzen mit ausreichender Nachweisgrenze von

ca. 25 µg/kg detektieren. Im Unterschied zu den nur ent fetteten Milchproben liegen die O.D.-Werte jedoch deutlich höher. Die eigentlich zu niedrigen O.D.-Werte bei Substanzgemischen treten hier ebenfalls auf (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tab. 9: Nachweis von Einzelsubstanzen und Substanzmischungen im Mischtest, Milch nur ent fettet

Konz. µg/kg	SDM		SMX		SMZ			
	O.D.	% O.D.	O.D.	% O.D.	O.D.	% O.D.		
200	0,356	36,89	0,693	55,07	0,558	50,22		
100	0,448	46,42	0,782	75,77	0,622	60,00		
50	0,519	53,78	0,757	73,35	0,666	59,95		
25	0,546	56,58	0,799	77,42	0,777	69,94		
0	0,965	100	1,032	100	1,111	100		
Konz. µg/kg	SDM+SMX*		SDM.SMZ*		SMX+SMZ*		SDM+SMX+ SMZ*	
	O.D.	% O.D.	O.D.	% O.D.	O.D.	% O.D.	O.D.	% O.D.
200	0,202	21,67	0,352	34,58	0,193	17,82	0,083	8,02
100	0,218	23,39	0,366	35,95	0,256	23,64	0,116	11,21
50	0,253	27,15	0,387	38,02	0,324	29,92	0,187	18,07
25	0,314	33,69	0,514	50,49	0,564	52,08	0,325	31,40
0	0,932	100	1,018	100	1,083	100	1,035	100

\* Mischung zu gleichen Teilen, Summe des Sulfonamidgehaltes entspricht der jeweiligen Konzentrationsstufe

### 3.5 Nachweis von SDM, SMX und SMZ in Feldproben

Die Feldproben sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und während der eigenen Arbeiten im Rahmen von Projekten des Institutes gezogen worden und standen daher - je nach Fragestellung und Art der Konservierung - teilweise nur in bereits aufbereiteter Form zur Verfügung. Soweit möglich, wurden jedoch die Proben mit beiden hier beschriebenen Techniken der Aufbereitung (Entfettung und Oxalsäurefällung) untersucht.

#### Nachweis in Herdensammelgemelksproben

Im November 1991 wurden Herdensammelgemelksproben von 197 Milcherzeugerbetrieben in Schleswig-Holstein gezogen. Die Milchproben waren sofort nach Eingang mit Oxalsäure 4 % aufbereitet und sodann bei -18 °C gelagert worden. Diese Proben konnten nur in den Monotests untersucht werden, da sie nach der späteren Entwicklung des Mischtestes bereits überlagert waren.

Es wurden jeweils Verdünnungsreihen der drei Substanzen in Konzentrationen von 0-50 µg/kg als Standard sowie fünf Nullproben aus hemmstofffreier Milch mitgeführt.

Positive und fragliche Proben wurden wiederholt untersucht, ebenso 10 zufällig gewählte, im 1. Testdurchlauf als negativ befundene Proben.

Desweiteren wurden im Rahmen eines anderen Projektes die Feldproben auf Zell- und Keimzahl sowie mit dem Charm-Test II (modifizierte Kiel-Methode) untersucht. Hier und im ELISA positive Proben wurden zur Bestätigung mit einer im Hause entwickelten HPLC-Methode (16) nachuntersucht.

In Tab. 10 sind vergleichend die Proben aufgeführt, die im ELISA auch nach Wiederholung ein positives bzw. fragliches Ergebnis aufwiesen. Es werden die Resultate aus allen drei Monotests, des Charm-Testes II, der HPLC, der Zellzählung sowie der Keimzahlbestimmung gegenübergestellt.



In allen Monotests traten beim 1. Testdurchgang zahlreiche fragliche und positive Proben auf. Ein großer Teil konnte in den ELISA-Wiederholungen sowie in der HPLC jedoch nicht bestätigt werden. Die Anzahl solcher Proben verteilt sich wie folgt auf die drei verschiedenen Tests (Ergebnisse nicht gezeigt): SDM 9, SMX 18 sowie SMZ 2.

Die Proben Nr. 21, 43, 50, 95, 104 und 108 waren im SDM-ELISA wiederholbar positiv. Ausgenommen Probe Nr. 50, waren bei diesen Proben die Untersuchungen auf SMX und SMZ negativ. Alle genannten Proben waren auch in der HPLC positiv.

Relativ geringe Konzentrationen an SDM, SMX oder SMZ in einem Bereich von 1,6-6,9 µg/kg nach ELISA-Ergebnissen können in der HPLC aufgrund der höheren Nachweisgrenze nicht bestätigt werden.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte weiterhin, daß die alleinige Erhöhung der Keimzahl oder der Zellzahl keinen Einfluß auf den ELISA hatte (Ergebnisse nicht gezeigt). Überschreiten jedoch beide Kriterien den Wert  $10^6$ , so waren die Ergebnisse im ELISA fraglich bis positiv, ebenso im Charm-Test II. Häufig traten dann unspezifische Einflüsse auf den ELISA in einer Probe bei allen drei Sulfonamiden auf, so z.B. bei Probe Nr. 26, 78 und 118.

Negativ in allen Untersuchungen waren bei SDM 171 Proben, bei SMX 170 und bei SMZ 188 Proben.

Tab. 10: Nachweis von SDM, SMX und SMZ in Monotests im ELISA aus 197 Feldproben (November 1991); HPLC, Charm-Test II, Elektronische Zellzahl sowie Keimzahl vergleichend dargestellt; Nachweisgrenze: µg/kg in ( )

Proben-Nr.	SDM			SMX			SMZ			Elektronische Zellzahl	Keimzahl
	X <sub>A</sub> 3 ELISAs	Charm II* (-20)	HPLC (>10)	X <sub>A</sub> 3 ELISAs	Charm II* (1)	HPLC (-12-15)	X <sub>A</sub> 2 ELISAs	Charm II* (-10)	HPLC (-20)		
21	31,6	+	17	-	-	-	-	-	-	3,7x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>4</sup>
24	2,1	+	-	3,0	-	-	-	-	-	1,4x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>
26	15,6	+	-	6,9	-	-	7,7	+	-	1,1x10 <sup>6</sup>	1,7x10 <sup>6</sup>
43	6,2	+	6	-	-	-	-	-	-	1,2x10 <sup>5</sup>	6,10 <sup>4</sup>
50	5,4	-	3	6,1	-	-	2,2	-	-	5,4x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>5</sup>
78	14,0	+	-	7,2	+	-	11,8	+	-	1,9x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>
95	3,3	-	4	-	-	-	-	-	-	1,2x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>
102	3,6	-	-	8,1	-	-	5,6	-	-	2,8x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>
104	4,3	+/-	5	-	-	-	-	-	-	7,9x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>
108	4,3	+/-	5	-	-	-	-	-	-	3x10 <sup>5</sup>	5,7x10 <sup>5</sup>
118	3,3	+/-,+	-	6,9	+/-,+	-	5,5	+/-,+	-	1,3x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>
155	7,0	-	-	4,9	-	-	-	-	-	3,3x10 <sup>5</sup>	5,4x10 <sup>5</sup>
160	5,2	-	-	-	-	-	13,3	-	-	2,7x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>4</sup>
161	4,4	-	-	1,6	-	-	-	-	-	2,3x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>4</sup>
176	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>
178	3,5	-	-	1,2	-	-	-	-	-	1,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>
181	2,2	-	-	5,5	-	-	6,1	-	-	2,9x10 <sup>5</sup>	7,8x10 <sup>5</sup>

\* Charm-Test nicht spezifisch

### Nachweis in UHT-Milch

#### - Nachweis in Monotests

Proben und Standardreihen (0-50 µg/kg) in UHT-Milch wurden mit Oxalsäure 4 % aufbereitet und anschließend getestet.

Tab. 11: Nachweis von SDM, SMX und SMZ in UHT-Milch in Monotests im ELISA – HPLC und Charm-Test II vergleichend dargestellt [252 Feldproben, August 1992; Nachweisgrenze: µg/kg in ( )]

Probe Nr.	SDM				SMX				SMZ			
	ELISA		Ch <sup>1)</sup>	HPLC	ELISA		Ch	HPLC	ELISA		Ch	HPLC
	1.Wh	2.Wh	(~20)	(>10)	1.Wh	2.Wh	(1)	(~12-15)	1.Wh	2.Wh	(~10)	(~20)
5	8	6	+	8/12	-	-	-	-	-	-	-	-
8	3	3	-	-	12	6	-	-	18	12	-	-
9	3	3	-	Spuren	-	-	-	-	-	-	-	-
54	6	5	-	3/5	-	-	-	-	-	-	-	-
82	3	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	7	3	-	-	10	6	-	-
95	6	6	-	3	50	18	-	-	40	50	-	-
98	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	3	3	+	-	100	40	-	-	100	100	-	-
245	-	-	-	-	25	12	-	-	40	50	-	-

<sup>1)</sup> Charm-Test

Zur Bestätigung wurden die positiven und fraglichen Proben im ELISA wiederholt sowie in der HPLC untersucht. Im Rahmen des gesamten Projektes wurden alle Proben auch mit dem Charm-Test II überprüft. In Tab. 11 sind die Resultate aufgeführt, vergleichend sind die Ergebnisse des Charm-Testes II und der HPLC dargestellt.

Die Proben Nr. 8, 94, 95, 99 und 245 waren entweder nach der Aufbereitung trüb oder schon vorher stark geronnen, was im ELISA zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Abzüglich dieser Proben sind für SDM 5 positive Ergebnisse, für die beiden anderen Substanzen keines zu verzeichnen.

Die Anzahl positiver oder fraglicher Proben, die durch Wiederholung des ELISAs nicht bestätigt werden konnten, betrug für SDM 9, für SMX 20 und für SMZ 18. Im Hinblick auf die Bestätigung der ELISA-Ergebnisse mit der HPLC gilt das bei den Herdensammelmelksproben Gesagte.

– Nachweis im Mischtest

Nach Entwicklung des Mischtestes wurden die im Monotest positiven und fraglichen UHT-Milchproben sowie eine Auswahl negativer Proben untersucht. Die eingefrorenen UHT-Feldproben sind nach dem Auftauen entfettet im Test eingesetzt worden. Die Lagerung bei -18 °C führte nach 6 Monaten zu zum Teil erheblicher Denaturierung, so daß die Ergebnisse nur eingeschränkt auswertbar sind (Tab. 12). Als Standard wurden 5 Nullproben aus frischer UHT-Milch verwendet.

Tab. 12: Nachweis von SDM, SMX und SMZ im Mischtest in UHT-Milch (Feldproben, n = 78), Nachweisgrenzen in ( ), Angaben in µg/kg

Proben-Nr.	Ergebnis im Monotest			Mischtest % O.D.
	SDM (>6,25)	SMX (>10)	SMZ (>10)	
5	8 / 6	-	6 / -	79,86
54	5 / 6	2 / -	4 / -	87,77
99	3 / 3	100 / 40	100 / 100	72,8

Auch hier sind die Proben >80 % als positiv zu betrachten, Probe Nr. 54 bestenfalls als fraglich. Alle anderen untersuchten Proben sind deutlich negativ, dies ist bei der im Vergleich zum Monotest deutlich geringeren Empfindlichkeit auch zu erwarten.

## 4. Diskussion

### 4.1 Testentwicklung

Zu Beginn der vorgestellten Arbeit war versucht worden, einen Test zu entwickeln, der einfach in der Anwendung ist und Sulfonamide im Sinne der EG-VO 675/92 erfaßt. Es lag nahe, unter Ausnutzung möglicher Kreuzreaktionen einen Test gegen das Grundgerüst der Sulfonamide (Sulfanilamid (SNA)) zu etablieren. In Pufferlösung konnte SNA nachgewiesen werden, was in Milch jedoch trotz der unterschiedlichen Aufbereitungsformen nicht wiederholbar war. Es ist denkbar, daß in der Milch zu viele Störeinflüsse wirksam werden, die neben der relativ geringen Größe des Moleküls eine Antigen-Antikörper-Reaktion unmöglich machen.

Weiter wurde überlegt, das vorhandene SNA-Antiserum unter Ausnutzung eventuell bestehender Kreuzreaktionen im Test gegen andere Sulfonamide wie zum Beispiel Sulfadimidin (SDM) einzusetzen; dies blieb jedoch ohne Erfolg. Verständlich wird dieses Ergebnis, wenn man in den später entwickelten Monotests die Untersuchung auf Spezifität betrachtet, in der zwischen SNA und SDM bzw. SMZ (Sulfamerazin) nur geringe, zwischen SMX (Sulfadimethoxin) und SNA keine Kreuzreaktionen bestehen.

So wurden schließlich Nachweisverfahren für die drei in der Veterinärmedizin mit am häufigsten gebrauchten Sulfonamide entwickelt (SDM, SMX, SMZ).

Für den Testaufbau wurde der kompetitive Antibody-Capture-ELISA gewählt, dessen Grundlagen unter anderem von HARLOW und LANE (27) beschrieben wurden.

Diese Anordnung bietet im Gegensatz zum Antigen-Capture Test den Vorteil, daß auf die zum Teil sehr aufwendige Synthese eines Hapten-Enzymkonjugates wie zum Beispiel SDM-Meerrettichperoxidase (32), verzichtet werden kann. Die für den Antibody-Capture Test nötigen Anti-Antikörper-Enzymkonjugate - wie in diesem Fall Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Schwein, gekoppelt an alkalische Phosphatase - sind dagegen im Handel erhältlich.

Wie sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab, waren zwei Formen der Probenaufbereitung möglich. Mit nicht aufbereiteten Milchproben ließen sich keine brauchbaren Ergebnisse erzielen (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### – *Entfettete Milch*

Die Entfettung der Milchproben als die einfachste Form der Aufbereitung erlaubt die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben schon deutlich ab einer Konzentration von 6,25 µg des entsprechenden Sulfonamides pro kg Milch.

Die zuverlässige Zuordnung der O.D.-Werte zu bestimmten Konzentrationsbereichen ist jedoch aufgrund der geringen Abstufung unmöglich.

#### – *Oxalsäure-Aufbereitung*

Um mögliche unspezifische Reaktionen zwischen Antiserum und Milchproteinen zu vermeiden, wurde im Anschluß an die Entfettung die Proteinfällung mit 4%iger Oxalsäure durchgeführt. Durch diese Aufbereitungsform erhält man sehr hohe und deutlich abgestufte O.D.-Werte. Es ist eine sichere Qualifizierung und Quantifizierung möglich, was im Hinblick auf den Einsatz des ELISA als eventuelle Bestätigungsmethode von großer Wichtigkeit ist.

Nach der Aufbereitung trübe Proben, die z.B. durch zu hohen Fettgehalt entstehen können, oder sinnfällig veränderte Proben (z.B. geronnen), die mit einer hohen Keim- und Zellzahl einhergehen, können im ELISA zu falsch positiven Ergebnissen führen. Trübungen können ebenfalls auftreten, wenn Proben in aufbereiteter Form länger als 6 Monate tiefgefroren bei -18 °C gelagert wurden.

Weiter erwähnenswert ist der hier im Vergleich deutlich geringere Antiserumverbrauch als bei entfetteten Milchproben.

• In dem Antigen-Capture Test von DIXON-HOLLAND und KATZ (30) werden die Milchproben durch Säurefällung mit 0,5 normaler Salzsäure für den Test vorbereitet. Dieser Test bringt ebenfalls deutliche Abstufungen in den Extinktionswerten, die Aufbereitungsform wurde jedoch nach der Etablierung der Oxalsäure-Aufbereitung nicht weiter verfolgt, da arbeitstechnisch bei beiden Formen der gleiche Aufwand besteht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für den quantitativen Sulfonamidnachweis zuvor die Proteinfällung mit Oxalsäure unumgänglich ist.

#### 4.2 Monotests zum Nachweis von SDM, SMX und SMZ

Für diese Tests wurden die üblichen Testparameter wie Wiederholbarkeit und Nachweisgrenze sowie Kreuzreaktionen mit anderen Antibiotika und Sulfonamiden bestimmt. Diese liegen im für immunochemische Tests zu erwartenden Rahmen.

Kreuzreaktionen von Bedeutung treten zwischen Sulfadimidin und Sulfamerazin sowie im gleichen Maße mit  $N_4$ -Acetyl-SDM und  $N_4$ -Acetyl-SMZ auf. Zurückzuführen ist dies auf die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden Sulfonamide. Auch andere Autoren beobachten eine Kreuzreaktion zwischen 30-56 % bei diesen genannten Stoffen (30, 32, 37). Eine nahezu vollständige Kreuzreaktion tritt zwischen den Reinsubstanzen und ihren jeweiligen  $N_4$ -Acetylmetaboliten auf. Für die Untersuchungen standen nur diese im Handel erhältlichen Metaboliten zur Verfügung, Aussagen über die 6-Hydroxy-Hauptmetaboliten können somit nicht getroffen werden. Bei der Beurteilung der Kreuzreaktion muß auch bedacht werden, daß nach NIELSEN (42) die Sulfonamide zum Teil konjugiert und zum Teil unverändert in die Milch sezerniert werden, wobei nur kleine Anteile auf den  $N_4$ -Acetyl-Metaboliten fallen. Nach NOUWS et al. (43) ist der Anteil der Metaboliten in der Milch ca. achtmal niedriger als der des Ausgangsstoffes. Folglich dürften diese Kreuzreaktionen bei der Untersuchung von Milch zu vernachlässigen sein. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die EG-Verordnung 675/92, die die Einhaltung der MRL nur für Muttersubstanzen fordert.

#### 4.3 Mischtest

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Testverfahren zu entwickeln, welches möglichst viele Sulfonamide erfaßt.

Daher wurde versucht, die drei beschriebenen Monotests miteinander zu kombinieren sowie in diesem kombinierten Test sowohl die einzelnen Substanzen, als auch die Kombination zweier oder dreier Sulfonamide nachzuweisen.

##### – Entfettete Milch

Diese Aufbereitungsform ist besonders im Hinblick auf die geplante Entwicklung eines einfachen Screening-Verfahrens von Bedeutung. Mit vertretbaren Serumkonzentrationen von je 1:1000 lassen sich die Einzelsubstanzen bereits ab einer Konzentration von je 25 µg/kg nachweisen (in den „Monotests“ ab ca. 6,25 µg/kg).

Wie aus Tab. 9 hervorgeht, führte die Summe der Konzentrationen von zwei Sulfonamiden zu einem deutlicheren Abfall der Extinktionswerte als bei den entsprechenden Einzelsubstanzen. Ausgeprägter ist dieses Phänomen noch bei der Kombination aller drei Sulfonamide in einer Probe.

Die Nachweisgrenze liegt jedoch in allen Fällen bei einer Konzentration von insgesamt 25 µg/kg.

Welche Faktoren zu der Wirkungssteigerung bei der Kombination mehrerer Antisera und Sulfonamide beitragen, ist nicht geklärt. Es wird jedoch deutlich, daß im Mischtest auffällige Proben in den Monotests bzw. in der HPLC nachuntersucht werden müssen, um eine Aussage über den tatsächlichen Sulfonamidgehalt treffen zu können.

Mit dem Mischtest aus entfetteter Milch liegt ein Screening-Verfahren vor, welches durch die einfache Probenaufbereitung ermöglicht, eine große Probenanzahl ohne das Mitführen gesondert aufbereiteter Standardreihen zu untersuchen. Die positiv/negativ-Einteilung wird auch hier durch den Vergleich der % O.D.-Werte der Probe mit dem Mittelwert der O.D.-Werte aus 5-6 Nullproben = 100 % ermittelt. Die Nachweisgrenze liegt in allen möglichen Kombinationsvarianten deutlich unter der nach EWG-Verordnung 675/92 geforderten MRL.

#### – Oxalsäure-Aufbereitung

Die Ergebnisse sind mit denen bei der entfetteten Milch vergleichbar, Vorteil ist nur die deutlich höhere Extinktion, die zu einer größeren Meßsicherheit führt. Das Phänomen des zu starken Extinktionsabfalles bei einer Kombination von zwei oder drei Substanzen tritt auch hier auf.

### 4.4 Nachweis von SDM, SMX und SMZ in Feldproben

#### *Nachweis in Herdensammelgemelksproben*

##### – Monotests

In allen Monotests traten Proben auf, die beim 1. Testdurchgang fraglich waren, d.h. unter der eigentlichen Nachweisgrenze des ELISA lagen. Sie konnten weder in der ELISA-Wiederholung noch in der HPLC bestätigt werden. Ein Nachweis in diesem Konzentrationsbereich (1-5 µg/kg) wird nach EWG-Verordnung nicht gefordert. Im SDM-ELISA wurden 6 Proben detektiert, die mehr als 10 µg SDM/kg Milch enthielten. Dies konnte in der Wiederholung des ELISA sowie in der HPLC, deren Nachweisgrenze für SDM bei ~10 µg/kg liegt, bestätigt werden. Lediglich Probe Nr. 50 zeigte im ELISA auch geringe Konzentrationen an SMX und SMZ, was in der HPLC aufgrund deren höherer Nachweisgrenze nicht bestätigt werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnte der Einfluß von Kreuzreaktionen sein (SMZ und Sulfadiazin, SMZ und Sulfadimidin); da es sich hier um Herdensammelgemelksproben handelt, wäre die Behandlung mehrerer Kühe mit verschiedenen Präparaten bzw. mit Kombinationspräparaten durchaus denkbar. Die Erhöhung entweder der Keimzahl oder der Zellzahl beeinflusst die Ergebnisse im ELISA nicht. Überschreiten beide Kriterien jedoch jeweils den Wert  $10^6$ /ml, so waren die Ergebnisse im ELISA in allen drei Monotests fraglich bis positiv, ebenso verhielt es sich im Charm-Test. Nach CHARM et al. (23) führen Bakterienzahlen  $>10^6$ - $10^7$ /ml zu falsch positiven Ergebnissen im Charm-Test II. Es ist in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt, ob die Bakterien den „Tracer“ binden, oder ob ein erhöhter Gehalt an PABA ursächlich beteiligt ist (21, 44, 10).

#### *Nachweis in UHT-Milch*

##### – Monotests

Im SDM-ELISA positive Proben (n = 8) konnten in der HPLC bestätigt werden. Proben, die geronnen oder nach Aufbereitung getrübt waren, führten zu falsch positiven Ergebnissen in allen drei ELISAs. Eine solcher Proben war ebenfalls im Charm-Test II positiv. Im Charm-Test II war neben der genannten Probe nur noch eine weitere positiv, diese war auch im ELISA und HPLC positiv. Andere im ELISA und HPLC positive Proben wurden mit dem Charm-Test II nicht detektiert.

## – Mischtest

Die UHT-Milchproben wurden nach dem Auftauen entfettet und im ELISA untersucht. Wegen der langen Lagerdauer waren die Proben zum Teil erheblich denaturiert. Die Ergebnisse sind daher mit Vorsicht zu betrachten.

Eine Probe, die im SDM-Monotest, in der HPLC und im Charm-Test II positiv war, wurde auch im Mischtest positiv eingestuft. Eine Probe ist im Mischtest fraglich, alle anderen sind negativ, was aufgrund der im Vergleich zu den Monotests deutlich geringeren Empfindlichkeit zu erwarten ist.

## 4.5 Zusammenfassende Bewertung

Die Monotests sind in der einfachen Aufbereitungsform (Entfettung der Milch) zur Positiv-/Negativ-Kontrolle einsetzbar, in der aufwendigeren Aufbereitungsform (Oxalsäurefällung) erlauben sie nicht nur die empfindliche Qualifizierung (Nachweisgrenzen je >10 µg/kg), sondern auch die Quantifizierung eventueller Sulfonamidrückstände.

Durch Untersuchungen an Feldproben wurden die Einsatzmöglichkeiten der ELISAs (Monotests) als Bestätigungsverfahren unter Zuhilfenahme der Ergebnisse aus HPLC-Untersuchungen aufgezeigt. Chromatographische Methoden stellen zur Zeit die einzige Möglichkeit dar, gewonnene Ergebnisse zu verifizieren. Mit dem ELISA käme eventuell ein spezifisches Verfahren hinzu, welches mit recht geringem Materialaufwand Sulfonamide in niedrigen Konzentrationen nachweisen kann.

Mit dem Mischtest steht ein Screening-Verfahren zur Verfügung, in dem große Probenzahlen bei einfachster Probenaufbereitung untersucht werden können. Auffällige Ergebnisse im Mischtest besagen jedoch nichts über den tatsächlichen Sulfonamidgehalt, da Kombinationen von Sulfonamiden zu deutlicheren Extinktionsabnahmen führen als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Die positiven Proben müssen sodann in der HPLC oder im Monotest quantifiziert und qualifiziert werden.

Interessant ist die Möglichkeit der Kombination der hier vorgestellten Testsysteme im Hinblick auf die Kopplung mit Antibody-Capture Tests für andere Antibiotika mit dem Ziel eines „Multi-Screening-Testes“. Dieses wäre theoretisch denkbar, da andere Antibody-Capture Tests wie z.B. für Streptomycine und Oxytetracyclin nach dem gleichen Prinzip aufgebaut sind. Wie im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt, besteht die Möglichkeit, verschiedene Coatsubstanzen bzw. Antiseren zu mischen und auf dieser Grundlage einen ELISA durchzuführen.

Die Anwendung dieses und ähnlicher Screening-Tests ist sicherlich nicht für die Untersuchung von Milch auf Erzeugerebene im Sinne der Milchgüteverordnung geeignet. Ein Einsatz durch Überwachungsbehörden und vor allem in Molkereien im Rahmen der eigenverantwortlichen Sorgfaltspflicht (Art. 14, EG-Milchhygiene-Richtlinie) wäre jedoch anzustreben.

## 5. Literatur

- (1) Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln - Arzneimittelgesetz (AMG), vom 24. August 1976 (BGBl. I S. 2445), zuletzt geändert durch das Vierte Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 11. April 1990 (BGBl. I S. 717)
- (2) WHO - World Health Organization : Evaluation of certain veterinary drug residues in food. 34<sup>th</sup> Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 788, 32-40 (1989)
- (3) Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen - Lebensmittel- u. Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG), vom 15. August 1974 (BGBl. I S. 1945), zuletzt geändert durch die Gesetze vom 22. Januar 1991 (BGBl. I S. 118 und S. 121)
- (4) Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an das Gewinnen, Behandeln und Inverkehrbringen von Milch (Milchverordnung) vom 23. Juni 1989 (BGBl. I S. 1140)

- (5) Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anliederungsmilch (Milch-Güteverordnung) vom 9. Juli 1980 (BGBl. I S. 878), zuletzt geändert durch die VO zur Änderung der Butterverordnung und anderer milchrechtlicher Verordnungen vom 16. August 1990 (BGBl. I S. 1774)
- (6) Rat der Europäischen Gemeinschaften : Richtlinie 92/46/EWG des Rates mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis vom 1. Juni 1992. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 268/1 (1992)
- (7) Rat/Kommission der Europäischen Gemeinschaften:
  - Verordnung (EWG) Nr. 2377 des Rates vom 26. Juli 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 224/1 vom 18.8.90
  - Verordnung (EWG) Nr. 675/92 der Kommission vom 18. März 1992 zur Änderung der Anhänge I und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 73/8 vom 19. März 1992
- (8) Heeschen, W. : Residues of antibiotics and sulfonamides in milk: significance and toxicological evaluation, legal situation within the European Community (EEC) and method-related activities of the International Dairy Federation (IDF). Symposium Lund, Sept. 17-19, Schweden. In: IDF Bulletin No. 283, 1993 (1991).
- (9) Heeschen, W. (1992): Bericht über ein Sachverständigengespräch zur Festlegung von Analyse- und Testverfahren für Milch (mikrobiologische Methoden) am 19. Juni 1992 bei der E-G-Kommission in Brüssel, Belgien
- (10) Suhren, G., Heeschen, W.: Deutsche Milchwirtschaft (48) 1632-1636 (1989)
- (11) Baumgartner, W., Lehner, B. und Sasshofer, K. : Wiener Tierärztl. Monatsschrift **73** (9) 299-304 (1986)
- (12) International Dairy Federation (IDF): Residues and contaminants in milk and milk products. Chapter 4. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds (W. Heeschen and A. Blüthgen) Special Issue 9101 (1991)
- (13) Pfleger, R.: Milchwirtsch. Berichte **84**, 181-184 (1985)
- (14) Alawi, M.A., Rüssel, H.A.: Fresenius Z. Anal. Chem. **307**, 382-384 (1981)
- (15) Diserens, J.-M., Renaud-Bezot, C., Savoy-Perroud, M.C. : Dt. Lebensmittel-Rundschau **87** (7) 205-253 (1991)
- (16) Suhren, G., Heeschen, W. : Anal. Chim. Ac. 275, 329-333 (1993)
- (17) Horie, M., Saito, K., Hoshino, Y., Nose, N., Hamada, N., Nakazawa, H. : Journ. of Chromatography 502, 371-378
- (18) Long, A.R., Hsieh, L., Malbrough, M., Short, C., Barker, S. (1990): J. Agric. Food Chem. **38**, 423-426 (1990)
- (19) Mengelers, M., Oorsprong, M., Kniper, H., Aerts, M., v. Gogh, E., v. Mierts, A. : Journ. of Pharmaceutical & Biomedical Analysis 7 (12) 1765-1776 (1989)
- (20) Schällibaum, M.: Deutsche Molkerei-Zeitung (24) 787-788 (1986)
- (21) Suhren, G., Heeschen, W.: Milchwissenschaft **42** (8) 493-496 (1987)
- (22) Brady, M.S., Katz, S.E. : Journ. of Food Protection 51, 8-11(1988)
- (23) Heeschen, W., Suhren, G., Milchwissenschaft **41** (12) 749-753 (1986)
- (24) Charm, S., Zomer, E., Salter, R.: Journ. of Food Protection 51, 920-924 (1988)
- (25) Suhren, G., Reichmuth, J., Heeschen, W.: Deutsche Milchwirtschaft (26) 812-816 (1991)
- (26) International Dairy Federation (IDF): Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. Section 1 - Detection of inhibitors, Section 2 - Detection of antibiotics and sulfonamides in milk and milk products - Special methods. IDF-Bulletin Nr. 258 (1991)
- (27) Harlow, E., Lane, D. :14. Immunoassays. In: Harlow, E. und Lane, D. (Hrsg.): Antibodies, A Laboratory Manual, S. 553-612. Cold Spring Harbour Laboratory (1988)
- (28) Agritech Systems, Inc.: Cite Sulfamethazine Test Kit (Produktinformation), 100 Fore Street, Portland, ME 04101, USA.
- (29) Bane, D.P., Kniffen, T.S., Hall, W.F.: Preventive Veterinary Medicine 7, 303-309 (1989)
- (30) Dixon-Holland, D.E., Katz, S.E.: J. AOAC **72** (3) 447-450 (1989)
- (31) Fleeker, J., Lovett, L.: J. AOAC **68** (2) 172-174 (1985)
- (32) Hoffmeister, A.: Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Suchtestes und eines hochdruckflüssigchromatographischen Bestätigungsverfahrens für Sulfadimidin in Milch. Diss. Agrarwissenschaften, Kiel (1991)
- (33) Idetek Inc.: Lactek Sulfamethazine Milk Screening Test (Produktinformation), 1057 Sneath Lane, San Bruno, CA 94066, USA
- (34) McCaughey, W.J., Elliott, C.T., Crooks, S.: Vet. Record 126, 323-326 (1990)
- (35) McMorris, C.J.: Sulphamethazine detection in tissue and urine. Int. Symp. on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Ghent, 19-22.5.1992, S. 72 (1992)
- (36) Meier, R., Usleber, E., Märtlbauer, E., Terplan, G.: Entwicklung und Charakterisierung von Enzymimmunoassays zum Nachweis von Sulfonamiden in Milch. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., 31. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhigiene“ vom 2.-5.10.1990 in Garmisch-Partenkirchen, S. 192-199 (1990)
- (37) Renson, C., Degand, G., Maghun-Rogister, G.: Anal. Chim. Ac. 275, 323-328 (1993)
- (38) Avrameas, S.: Immunochemistry 6, 43-52 (1969)
- (39) Hebert, G.A., Pelham, P.L., Pittman, B.: App. Microbiol. 25, 26-36 (1973)
- (40) Kirchoff, H.: Entwicklung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für Streptomycine in Milch. Dissertation, FU Berlin, Journal-Nr. 1628 (1992)
- (41) Kommission der Europäischen Gemeinschaften (1981): Entscheidung der Kommission vom 14. November 1989 zur Festlegung der Referenzmethoden und des Verzeichnisses der einzelstaatlichen Referenzlaboratorien für Rückstandsuntersuchungen (89/610/EWG). Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 351/39 vom 2. Dez. 1989
- (42) Nielsen, P.C.: Biochem. J. 136, 1039-1045 (1973)
- (43) Nouws, J.F.M., Vree, T.B., Breukink, H.J., Baakman, M., Driessens, F. und Smulders, S.: Tijdschrift voor Diergeneeskunde **110** (23) 1015-1024 (1985)
- (44) Carlsson, A., Björck, L.: Milchwissenschaft **44** (1) 7-10 (1989)

## 6. Zusammenfassung

Grether, A., Hammer, P., Heesch, W.: **Zum immunchemischen Nachweis ausgewählter Sulfonamide in Milch.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **46** (2) 99–126 (1994)

### 06 Milchhygiene (Sulfonamidrückstände)

Das Vorkommen von Sulfonamidrückständen in Milch wird unter praktischen Verhältnissen nach qualitativ-technologischen Gesichtspunkten (Qualitätsbeziehung nach Milch-Güte-VO) und nach lebensmittelhygienischen Aspekten beurteilt. Die Untersuchung auf „Güte“ der Milch gewährleistet für diese Wirkstoffe nicht die gesundheitliche Unbedenklichkeit.

Die Sulfonamide finden heute ein breites Anwendungsspektrum beim laktierenden Rind. Aufgrund der Vielfalt der Sulfonamide wurden für diese Arbeit drei häufig verwendete Wirkstoffe ausgewählt:

Sulfadimidin (SDM), Sulfadimethoxin (SMX) und Sulfamerazin (SMZ).

Nach EWG-VO 675/92 wird eine Maximum Residue Limit (MRL) für die Summe der Sulfonamide von 100 µg/kg Milch gefordert. Dieser Wert wurde in das Ziel dieser Arbeit, ein möglichst breites Spektrum der Sulfonamide qualitativ und quantitativ zu erfassen, aufgenommen.

Nach Immunisierung von Kaninchen mit einem SDM- bzw. SMX- bzw. SMZ-BSA Immunogen konnten polyklonale Antikörper gewonnen werden. Mit Hilfe dieser Antisera wurde für jede Einzelsubstanz (Monotests) ein ELISA auf der Grundlage des Antibody-Capture Tests etabliert. Die Milchprobenaufbereitung kann dabei in zwei Formen erfolgen:

1. Entfettung (rein qualitative Aussage der Testergebnisse)
2. Oxalsäureaufbereitung (qualitative und quantitative Aussage)

Die Nachweisgrenze liegt bei allen drei Substanzen jeweils unter 10 µg/kg.

Um der EWG-VO 675/92 zum Nachweis der Summe der Sulfonamide zu genügen, wurden die drei Einzeltests zu einem sog. Mischtest kombiniert. Die Probenaufbereitung kann analog zu den Monotests in den genannten zwei Formen erfolgen. Mit dem Mischtest gelingt die rein qualitative Detektion der Einzelsubstanzen und der Kombination zweier oder mehrerer Sulfonamide im Bereich von 25-50 µg/kg.

Anschließend wurden mit beiden Testverfahren (Mono- und Mischtest) Feldproben untersucht.

Im November 1991 wurden 197 Rohmilchproben von Milcherzeugerbetrieben in Schleswig-Holstein gezogen. 6 Proben waren im SDM ELISA positiv, was sich durch die HPLC-Untersuchung bestätigen ließ.

Desweiteren wurden 252 UHT-Milchproben aus Europa untersucht, hier fielen 5 Proben im SDM ELISA durch ein positives Ergebnis auf. Diese Proben waren ebenfalls in der HPLC positiv.

Im Mischtest waren 2 Proben positiv, wobei hier das Probenalter zum Zeitpunkt der Untersuchung berücksichtigt werden muß.

Es konnten somit empfindliche Nachweisverfahren für die Einzelsubstanzen entwickelt werden, die entweder eine qualitative und quantitative oder nur eine quantitative Aussage zulassen. Die Aufbereitung der Proben ist sehr einfach. Mit dem Mischtest ist



es möglich, mehrere Sulfonamide qualitativ zu detektieren. Es wäre denkbar, die entwickelten Methoden als Routinemethoden im Rahmen eines integrierten Untersuchungskonzeptes nach EWG-VO 675/92 sowie innerhalb der betrieblichen Eigenkontrollen gemäß Art. 14 der EG-Milchhygienerichtlinie 92/46 als Screening-Verfahren einzusetzen.

## Summary

Grether, A., Hammer, P., Heeschen, W.: **Development of Enzyme Immuno Assays for the Detection of Certain Sulfonamides in Milk.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **46** (2) 99–126 (1994)

### 06 Milk-hygiene (residues from sulfonamides)

In practice the occurrence of residues from sulfonamides in milk are considered by a qualitative-technological point of view (quality payment) and by milk-hygienic aspects. The examination of „quality“ of milk normally doesn't guarantee the toxicological safety.

Nowadays sulfonamides are often used for the treatment of dairy cattle. As there are many sulfonamides three most common sulfonamides were selected: Sulfadimidine (SDM), Sulfadimethoxine (SMX) and Sulfamerazine (SMZ).

According to ECC-Regulation 675/92 the Maximum Residue Limit for the sum of sulfonamides is defined by 100 µg/kg.

Anti-SDM/SMX/SMZ sera with high titers were raised in rabbits. With those sera an ELISA (Antibody Capture Test) was established for each sulfonamide („single“ ELISA). Two different types of preparation of the milk samples allowed the detection of the three sulfonamides as follows: either quantification (milk only skimmed) or qualification and quantification (milk prepared with oxalic acid). In all cases the detection limit was below 10 µg/kg.

To satisfy the claim of the ECC-Regulation to detect the sum of sulfonamide residues with 100 µg/kg, the three „single“ ELISA's were combined to one („mixed ELISA“). The preparation of the samples is the same as for the single tests. Thereupon it was possible to detect the combination of two or more sulfonamides between 25 and 50 µg/kg (only qualification). Finally both types of test systems (single and mixed ELISA) were used for the examination of field samples.

197 field samples (herd milk) from November 1991 were tested, 6 of them contained SDM which was verified by HPLC. 252 UHT milk samples from Europe were also tested, 5 of them were positive in the SDM ELISA. The same result was reached by HPLC. Due to the age of the samples the two positive results in the mixed ELISA have to be regarded carefully.

In conclusion sensitive tests were developed which can be used for qualification and quantification or only for quantification with quite a simple milk preparation step. A combination of sulfonamides can be detected by the mixed ELISA. It would be possible to use the tests developed as „practical methods“ according to an integrated detection system (ECC-Regulation 675/92) as well as for controls in dairies just as a screening system (Art. 14 EEC Directive 92/46).

## Résumé

Grether, A., Hammer, P., Heeschen, W.: **Mise au point d'un „Enzyme Immuno Assay” pour déceler des sulfonamides dans le lait.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **46** (2) 99–126 (1994)

### 06 L'hygiène du lait (résidus de sulfonamides)

Dans la pratique la présence de résidus de sulfonamides dans le lait est évaluée du point de vue de la qualité et la technologie (paiement selon la qualité), ainsi que de l'hygiène du lait. L'analyse du lait par rapport à sa „qualité” n'est pas nécessairement une garantie pour son innocuité par rapport à ces substances.

A présent, les sulfonamides sont fréquemment appliquées pour traiter le bétail laitier. Comme il y a de nombreuses sulfonamides on a choisi, pour cette étude, 3 agents qui sont fréquemment utilisés: la sulfadimidine (SDM), la sulfadiméthoxine (SMX) et la sulfamérazine (SMZ).

Selon le Règl. 675/92 de la CEE on exige un „Maximum Residue Limit” (MRL) de 100 µg/kg lait pour la somme des sulfonamides.

A l'aide d'antisérums (SDM/SMX/SMZ) avec des titres élevés obtenus à partir des lapins on a développé un „ELISA” („Antibody Capture Test”) pour chaque sulfonamide („single ELISA”). La préparation des échantillons du lait se fait comme suit: dégraissage - résultats seulement qualitatifs; préparation avec l'acide oxalique - résultats qualitatifs et quantitatifs. Dans tous les cas, la limite de détection est respectivement au-dessous de 10 µg/kg.

Pour satisfaire aux exigences du Règl. 675/92 de la CEE, à savoir la détection de la somme des sulfonamides susmentionnée, on a combiné les 3 „single ELISA's” pour obtenir un „mixed ELISA”. La préparation des échantillons se fait de la même façon que pour les tests individuels. Avec le „mixed” ELISA, il est possible de détecter qualitativement les substances individuelles et la combinaison de 2 ou plus de sulfonamides entre 25 et 50 µg/kg.

Ensuite, les 2 systèmes de test („single” et „mixed” ELISA) ont été utilisés dans des expériences dans les conditions de la pratique.

En novembre 1991, on a analysé 197 échantillons du lait cru; six d'eux contenaient de la SDM, ce qui a aussi été vérifié à l'aide de la CLHP.

On a également analysé 252 échantillons du lait UHT provenant de l'Europe; parmi eux 5 s'étaient avérés positifs (SDM ELISA); ceci a été confirmé par la CLHP.

Avec le „mixed ELISA” on a obtenu 2 résultats positifs, mais ici il faut prendre l'âge des échantillons au moment de l'analyse en considération.

Pour conclure, des tests sensitifs ont été développés pour les substances individuelles qui permettent d'obtenir des résultats qualitatifs et quantitatifs ou bien seulement quantitatifs. La préparation des échantillons est très simple. A l'aide du „mixed ELISA” on peut déceler plusieurs sulfonamides qualitativement. Il serait possible d'utiliser les tests développés comme des „méthodes de routine” dans le cadre d'un système d'analyse intégré selon le Règl. 675/92 de la CEE et comme contrôles (tests de tri) dans des laiteries selon l'art. 14 de la Directive 92/46 de la CEE.