

Amtliche Kontrolle von Fleisch, Milch und Eiern auf Chloramphenicol und Sulfadimidin mit adaptierten Enzymimmunoassays = Official control of meet, milk, and eggs on chloramphenicol and sulfadimidine by adapted enzymimmunoassays

Autor(en): **Strebel, Karl / Schneider, Nicole**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **86 (1995)**

Heft 3

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983632>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Amtliche Kontrolle von Fleisch, Milch und Eiern auf Chloramphenicol und Sulfadimidin mit adaptierten Enzymimmunoassays

Official Control of Meat, Milk, and Eggs on Chloramphenicol and Sulfadimidine by Adapted Enzymimmunoassays

Key words: Animal drug residue control, Chloramphenicol, Sulfadimidine, Enzymimmunoassay

Karl Strebel und Nicole Schneider
Kantonales Laboratorium Zürich, Zürich

Einleitung

Die amtliche Kontrolle der zugelassenen Höchstkonzentration von pharmakologischen Wirkstoffen, die im Anhang der Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe (FIV) aufgelistet sind, erfordert immer mehr hochempfindliche, spezifische Untersuchungsmethoden. In der neusten Liste der zugelassenen Höchstkonzentrationen für pharmakologische Wirkstoffe in Lebensmitteln, die mit der neuen Lebensmittelverordnung in Kraft gesetzt werden soll, wurde die Zahl der aufgelisteten Wirkstoffe von 40 auf ca. 60 erhöht. Der Trend vom unspezifischen Hemmstofftest (Vierplatten-, Delvo-Test) zum spezifischen Test, mit dem ein Wirkstoff im Bereich des Grenz- oder Toleranzwertes quantitativ erfasst werden kann, ist weltweit deutlich erkennbar.

Bei den gegenwärtigen Rahmenbedingungen für die Produktion tierischer Lebensmittel kann nicht ohne weiteres auf Tierarzneimittel verzichtet werden. Der rege Tierverkehr und die intensive Massentierhaltung in hygienisch ungeeigneten Haltungssystemen begünstigen das Einschleppen und Ausbreiten von Infektionserregern. Der Tierhalter wird gezwungen, nicht nur beim Auftreten von Infektionskrankheiten, sondern auch zur Vorbeugung, z. B. beim Einstallen, Tierarzneimittel einzusetzen. Vom Gesetz her wird jeder Tierhalter verpflichtet, seine Tiere so zu füttern und zu pflegen, dass sich in den produzierten tierischen Lebensmitteln keine verbotenen Stoffe und keine Stoffe in Mengen befinden, welche die vorgeschriebenen Grenz- und Toleranzwerte übersteigen. Diese Sorgfaltspflicht des Tierhalters zu kontrollieren ist Aufgabe der amtlichen Kontrolle.

Chloramphenicol (CAP) und Sulfadimidin (SMA) sind pharmakologische Wirkstoffe von zahlreichen Tierarzneimitteln, die in der Schweiz bevorzugt eingesetzt werden. Das breite Wirkungsspektrum, die hohe Wirksamkeit, auch bei der Verabreichung über das Futter, sowie die geringen Kosten geben diesen antibakteriellen Wirkstoffen, insbesondere Chloramphenicol, eine bevorzugte Stellung. Da CAP in der therapeutischen Anwendung beim Menschen als Ursache für vereinzelte, spontan aufgetretene Fälle aplastischer Anämie angenommen wird und keine Schwellendosis für die Nebenwirkung auf das blutbildende System des Menschen ermittelt werden konnte, wurde in der FIV ein Grenzwert für CAP in Fleisch, Milch oder Eier von 0,001 mg/kg festgelegt.

Eine wirkungsvolle Rückstandskontrolle bei Fleisch bzw. bei Schlachtkörpern stellt sehr hohe Anforderungen an die Untersuchungsmethoden. Zum einen müssen viele Schlachtkörper in die Kontrolle einbezogen werden, da die Rückstandssituation bei den angelieferten Tieren zumindest von Herkunftsbestand zu Herkunftsbestand unterschiedlich sein kann. Zum anderen müssen die Ergebnisse in kurzer Zeit vorliegen, weil die Schlachtkörper z. T. bereits nach weniger als einer Stunde zerlegt oder abtransportiert werden. Für solche Aufgaben kommt den immunochemischen Untersuchungsmethoden eine Vorrangstellung zu, weil mit ihnen sehr empfindlich, spezifisch und schnell grössere Probenzahlen mit einem vertretbaren Aufwand untersucht werden können. Da wir seit mehreren Jahren Fleisch, Milch und Eier mit bereits beschriebenen Enzymimmunoassays (2, 4) untersuchen, für die wir seit einiger Zeit in unserem Labor selber Immunreagenzien herstellen, stehen uns Antikörper und markierte Analyte in grosser Menge zur Verfügung, um Methoden anpassen zu können. Die Optimierung der Testsysteme, ihre Charakterisierung im Puffer und der Einfluss der Matrix von minimal aufbereiteten Proben auf die Testsysteme und eine praxisorientierte Methode zur semi-quantitativen und quantitativen Bestimmung von CAP und SMA in Fleisch, Milch und Eiern werden im folgenden beschrieben.

Material und Methoden

Reagenzien

- Natriumchlorid p.a., z. B. Merck Art.-Nr. 6404
- di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei p.a., z. B. Merck Art.-Nr. 6586
- Kaliumdihydrogenphosphat p.a., z. B. Merck Art.-Nr. 4873
- Citronensäure-Monohydrat p.a., z. B. Merck Art.-Nr. 244
- 1 M Kaliumhydroxidlösung
- Perhydrol 30% p.a., z. B. Merck Art.-Nr. 7209
- 1 M Schwefelsäure
- 3, 5, 3', 5'-Tetramethylbenzidin (TMB), z. B. Serva Art.-Nr. 35926
- Azeton p.a.

- Methanol p.a.
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) z.S., z. B. Merck Art.-Nr. 822184
- Thimerosal (Merthiolat), Mercury-[(o-carboxyphenyl)thio]-ethyl Natriumsalz, 98%, z. B. Sigma: T-5125
- Caseinhydrolysat für Mikrobiologie, z. B. Fluka Art.-Nr. 22090
- Casein von Kuhmilch, z. B. Sigma: C-8654

Puffer und Lösungen

- Thimerosallösung: 1 g Thimerosal in 10 ml deionisiertem Wasser lösen (eventuell im Ultraschallbad lösen)
- Phosphatpuffer (PBS-2): 0,01 M
3,51 g Natriumchlorid
0,65 g di-Natriumhydrogenphosphat
0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat
in 500 ml sterilem, deionisiertem Wasser lösen
pH von Puffer kontrollieren evtl. auf 7,2 einstellen
Puffer mit 250 µl Thimerosallösung konservieren
- Coat-Puffer: PBS-2 (Verdünnung des Antiserums oder Anti-Immunglobulins siehe unter spezielle Testreagenzien)
- Blockierungspuffer: 1 g Caseinhydrolysat in 100 ml PBS-2 lösen
1 g Casein lösen in 100 ml PBS-2 (über Nacht lösen bei 4 °C, danach Ultraschall und Rühren!)
- Waschlösung: 35 g Natriumchlorid und 2,5 ml Tween 20 in 5 l deionisiertem Wasser lösen
- H₂O₂-Puffer: 22,06 g Citronensäuremonohydrat in 400 ml sterilem, deionisiertem Wasser lösen
100 ml 1 M Kaliumhydroxidlösung dazugeben
die Lösung mit 5 N Natriumhydroxidlösung auf pH von 3,9 einstellen
200 µl Perhydrol hinzufügen (Konservierung)
- Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung: 100 mg TMB in 2 ml Azeton lösen
anschliessend 18 ml Methanol zugeben (21 mmol/l)
vor Licht geschützt bei Raumtemperatur aufbewahren
- Substrat: 20 Volumenteile H₂O₂-Puffer und 1 Volumenteil TMB-Lösung unmittelbar vor Gebrauch mischen (ca. 30 min lichtgeschützt haltbar)

Testspezifische Reagenzien und Lösungen

- | | |
|---|------------------------|
| Chloramphenicol (CAP) U.S.P. krist. purum | z. B. Fluka-Nr. 23275 |
| Chloramphenicol Hydrogensuccinat | Böhringer, Mannheim |
| Chloramphenicol Glucuronid | z. B. Sigma-Nr. C-9899 |

Thiamphenicol	z. B. Sigma-Nr. T-02601
Chloramphenicol Base	z. B. Sigma-Nr. C-0135
Sulfamethazin (SMA, auch Sulfadimidin genannt)	z. B. Sigma-Nr. S 6256
Lösungen mit spezifischem Anti-Serum (AS) zum Beschichten der Mikroröhrchen oder Mikrotiterplatten mit Antikörpern	
CAP-AS (R71.2.7) in einer Verdünnung von	1: 30 000
SMA-BSA-AS (R83.3.47/50) in einer Verdünnung von	1: 50 000
zur Verdünnung wird PBS-2 verwendet	
Lösungen von enzymmarkiertem Analyt (Analyt-PO)	
CAP-PO (R42.9.25) in einer Verdünnung von	1:100 000
SMA-PO (R86.1.48) in einer Verdünnung von	1: 40 000
Zum Verdünnen wird Blockierungspuffer oder eine 1%ige Caseinlösung verwendet.	

Geräte

Mikroröhrchen (MR):	aus spezifiziertem Polystyrol (flacher Boden, 16 Mikroröhrchen pro Modul, 6 Module werden in einem Rahmen zu einer Mikrotiterplatte (MTP) zusammengefasst z. B. MicroWell Module von Nunc (Maxisorp F16) oder Immunolon IV von Dynatech
Pipetten:	100–1000 µl variabel mit Einwegspitzen 10–100 µl variabel mit Einwegspitzen
Mehrkanalpipetten:	20–100 µl variabel mit Einwegspitzen
Reservoire:	für Lösung von markiertem Analyt, Substrat und Stopplösung
Glasflaschen:	10 ml für Standardlösungen 15 ml Braunglas für Verdünnung von markiertem Analyt 500 ml für Stopplösung 500 ml für Substratpuffer 30 ml Braunglas für Chromogenlösung
Schüttler:	für MTP zum Homogenisieren der gefärbten Substratlösung
Schüttler:	für Glasflaschen mit Standards und Reagenzien (Vortex)
Spektrofotometer:	zum Lesen von MTP mit Filter für 450, 470 und 630 nm (Mikroplate Reader, MR 610, Dynatech)
Metallschachtel:	für die dunkle und feuchte Inkubation der beschickten MTP
Waschgerät:	Multi-Reagens-Wascher (MRW, Art. AM60/4, Dynatech)

Herstellung der Immunogene und der markierten Analyte

Bei der Synthese des Immunogens CAP-BSA wurde Chloramphenicol-Base mittels Dimethyladipimidat an bovines Serumalbumin (BSA), und für die Markierung von CAP wurde Chloramphenicol Hydrogensuccinat mit der aktiven Estermethode an Peroxidase kovalent gekoppelt (4). SMA wurde mit der Glutaraldehydmethode an BSA gekoppelt zur Herstellung des Immunogens und mit der zweistufigen Glutaraldehydmethode an Peroxidase zur Herstellung des markierten Sulfadimidins (2).

Erzeugung der spezifischen Antiseren (AS)

3 Kaninchen wurden mit ca. 250 µg des Immunogens CAP-BSA und 1 Kaninchen mit ebenfalls ca. 250 µg des Immunogens SMA-BSA nach der Methode von *Niederschlag* (13) immunisiert. Ab der 4.–6. Woche wurde die Induktion von Antikörpern anhand des Gehalts an analytspezifischen Antikörpern (AK) im Serum verfolgt (Abb. 1 und 2). Zu voraussehbaren optimalen Zeitpunkten wurden grössere Mengen Blut entnommen. Die Seren von den verschiedenen Blutentnahmen wurden sterilfiltriert, portioniert und unter folgenden Bedingungen gelagert: bei 4 °C in den Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:100, bei –20 °C in einer Mischung von Ethylenglycol PBS-2 (1/1), bei –20 °C und –45 °C tiefgefroren. Die Bestimmung des relativen Gehalts an spezifischen AK in den Antiseren wurde mit einer EIA-Methode durchgeführt, bei der die Mikroröhrchen mit einem Antikaninchen-AK beschichtet waren (3).

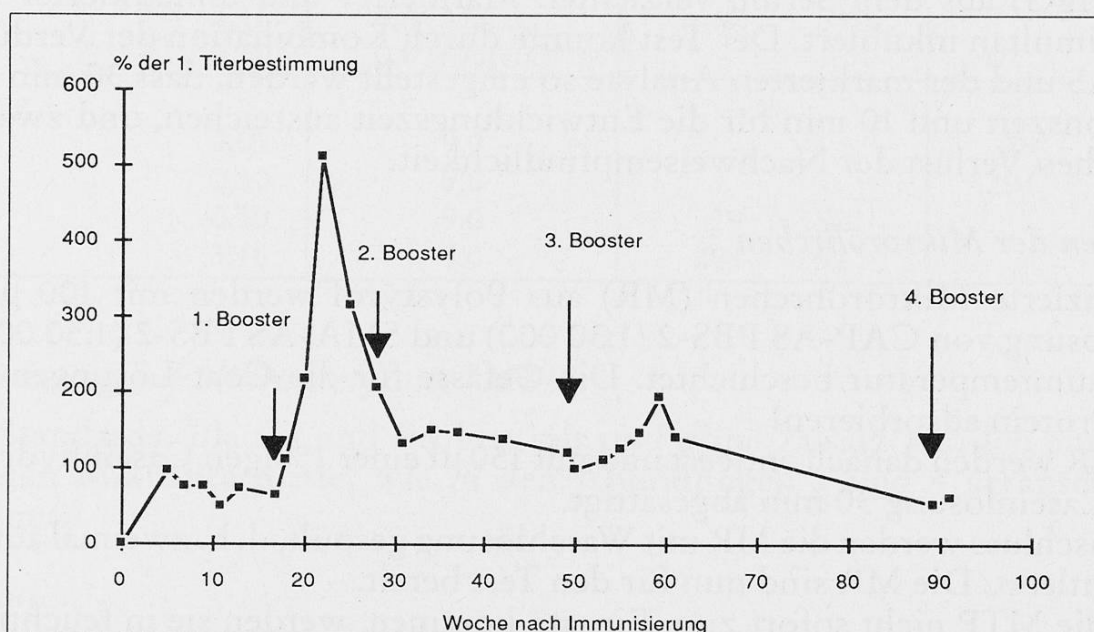


Abb. 1. Titerverlauf von Kaninchen A nach dem Immunisieren mit CAP-BSA (Booster: zweite oder folgende Injektion von Immunogen)

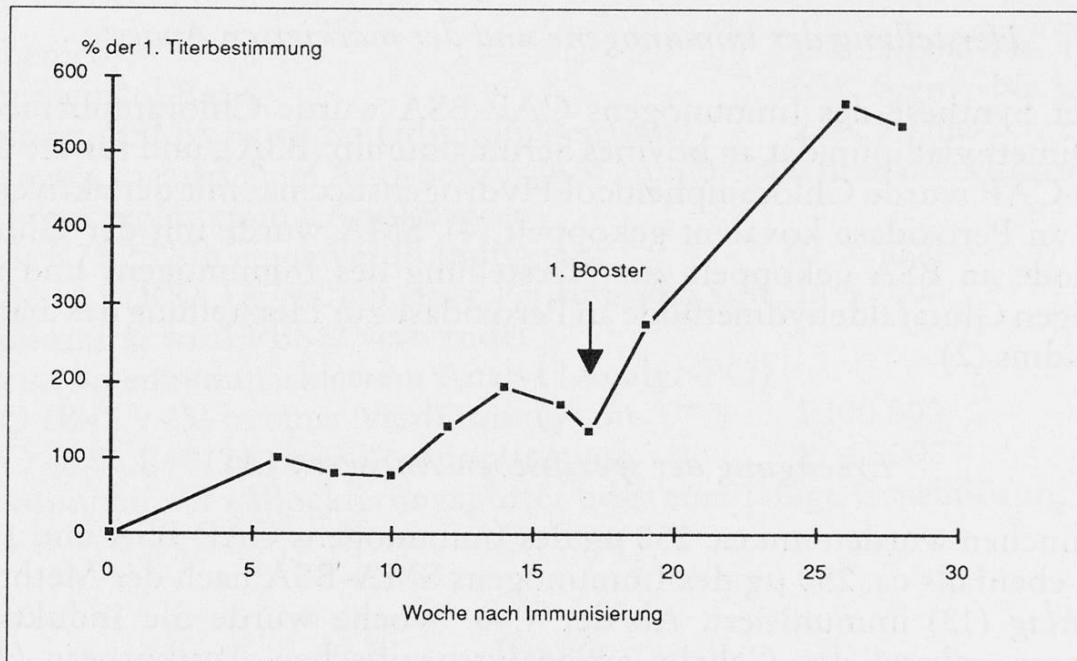


Abb. 2. Titerverlauf von Kaninchen B nach dem Immunisieren mit SMA-BSA

Die Testsysteme für den Nachweis von CAP und SMA

Als einfaches Testsystem bot sich der direkte kompetitive Enzymimmunoassay an, bei dem die Mikroröhrchen direkt mit analytspezifischen AS beschichtet werden. Da bereits beim EIA für die Titerkontrolle der Blutproben die Antiseren in einer Verdünnung bis 1:50 000 eingesetzt werden konnten, wurde auf eine Fällung der AK (IgG) aus dem Serum verzichtet. Markierter und unmarkierter Analyt wurden simultan inkubiert. Der Test konnte durch Kombination der Verdünnungen des AS und der markierten Analyte so eingestellt werden, dass 30 min für die Inkubationszeit und 10 min für die Entwicklungszeit ausreichen, und zwar ohne wesentlichen Verlust der Nachweisempfindlichkeit.

Beschichten der Mikroröhrchen

- Spezifizierte Mikroröhrchen (MR) aus Polystyrol werden mit 100 µl einer Coatlösung von CAP-AS PBS-2 (1:30 000) und SMA-AS PBS-2 (1:50 000) 16 h bei Raumtemperatur beschichtet. Die Gefäße für die Coat-Lösungen dürfen kein Protein adsorbieren!
 - Die MR werden danach entleert und mit 150 µl einer 1%igen Caseinhydrolysat- oder Caseinlösung 30 min abgesättigt.
 - Im Anschluss werden die MR mit Waschlösung gespült, d. h. zweimal aufgefüllt und entleert. Die MR sind nun für den Test bereit.
- Falls die MTP nicht sofort zum Einsatz kommen, werden sie in feuchtigkeitsdichten Kunststoffolien eingeschweisst und bei -20°C gelagert.
- Jede Charge frisch beschichteter Mikrotiterplatten wird anhand der Nullwerte auf Aktivität und Homogenität und mit zwei Standards auf Empfindlichkeit geprüft (Tabelle 4).

Herstellen der Standardlösungen

Die Verdünnungsreihen der Standards mit halblogarithmischen Abstufungen wurden in Glasgefäßen bereitete, deren Oberfläche mit Analyt abgesättigt wurde (Tabelle 1).

SMA-Stammlösung (SL): 50 mg SMA in 50 ml Acetonitril lösen (10^6 ng/ml, interne Bezeichnung: S6), Lagerung bei 5 °C, mindestens 1 Jahr haltbar

CAP-Stammlösung (SL): 10 mg CAP in 100 ml Methanol (10^5 ng/ml, interne Bezeichnung: S5): Lagerung bei -20 °C, mindestens 1 Jahr haltbar
Standardlösungen sind mindestens drei Tage haltbar bei 5 °C.

Tabelle 1. Herstellung der Standardlösungen

Standard-Bezeichnung	Gehalt (ng/ml)	PBS-2/Matrix (ml) +	SMA Standard (µl)	CAP Standard (µl)
S4	10 000,00	9,0	91 SL	
S3	1 000,00	9,0		91 SL
S2	100,00	9,0	91 S4	
S1,5	31,60	6,0	2775 S2	
S1	10,00	9,0	1000 S2	91 S3
S0,5	3,16	9,0/6,0	294 S2	2775 S1
S0	1,00	9,0	91 S2	1000 S1
S-0,5	0,32	9,0	29 S2	294 S1
S-1	0,10	9,0		91 S1
S-1,5	0,03	9,0		29 S1
S-2	0,01	9,0		9 S1
Zusatz	3,16	0,6 (Matrix)	67 S1,5	
Zusatz	0,10	0,6 (Matrix)		67 S1
Screening				
S-1,5	0,03	9,0		29 S1
S-0,5	0,30	9,0		294 S1
S-0,5	0,30	9,0	29 S2	
S0,5	3,16	9,0	294 S2	

Testanordnung auf Mikrotiterplatte (MTP)

Die Standards, Blanks und Proben mit und ohne Zusatz wurden auf der beschichteten Mikrotiterplatte, wie in den Abbildungen 3 und 4 veranschaulicht, angeordnet.

Testablauf

1. Testvorbereitung

Reagenzien und beschichtete MTP (in der Verpackung) auf RT aufwärmen lassen und Reagenzien und Standards zubereiten (enzymmarkierte Reagenzien vor Licht schützen).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉	P ₁₀
B	S _{-1.5}	0	P ₁									
C	S _{-1.5}	0	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₃	P ₁₄	P ₁₅	P ₁₆	P ₁₇	P ₁₈	P ₁₉	P ₂₀
D	S _{-1.5}	0	P ₁₁									
E	0	S _{0.5}	P ₂₀	P ₂₂	P ₂₃	P ₂₄	P ₂₅	P ₂₆	P ₂₇	P ₂₈	P ₂₉	P ₃₀
F	0	S _{0.5}	P ₂₀									
G	0	S _{0.5}	P ₃₁	P ₃₂	P ₃₃	P ₃₄	P ₃₅	P ₃₆	P ₊	P ₊	P ₊	P ₊
H	0	S _{0.5}	P ₃₁									

Abb. 3. Anordnung der Blanks (BL), der Nullwerte (0), der Standards (S) und der Proben mit (P+) und ohne Zusatz (P) beim *Screening* (Bsp. CAP)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	0	0	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
B	S _{0.5}	S _{0.5}	S _{0.5}	0	P ₁							
C	S ₀	S ₀	S ₀	0	P ₁							
D	S _{0.5}	S _{0.5}	S _{0.5}	0	P ₁							
E	S ₋₁	S ₋₁	S ₋₁	0	P ₁₊	P ₂₊	P ₃₊	P ₄₊	P ₅₊	P ₆₊	P ₇₊	P ₈₊
F	S _{-1.5}	S _{-1.5}	S _{-1.5}	0	P ₁₊							
G	S ₋₂	S ₋₂	S ₋₂	0	P ₁₊							
H	0	0	0	0	P ₁₊							

Abb. 4. Anordnung der Blanks (BL), der Nullwerte (0), der Standards (S) und der Proben mit (P+) und ohne Zusatz (P) für die *quantitative Bestimmung* (Bsp. CAP)

2. Testansatz

50 µl Probe (P_x) oder Standard (S_x) zügig nach Vorlage in MR pipettieren (Abb. 1 oder 2). 50 µl enzymmarkiertes Analyt hinzupipettieren (CAP-PO 1:100 000 oder SMA-PO 1:40 000, normalerweise mit Blockierungspuffer verdünnen, bei Milch eine 1%ige Caseinlösung verwenden). Die MTP wird mit Polystyroldekel abgedeckt. MTP auf Schüttler kurz mischen.

3. Inkubation

30 min bei RT in dunkler feuchter Kammer inkubieren (*Substrat bereiten*: 20 ml

H₂O₂-Puffer in Reservoir vorlegen und mit 1 ml TMB-Lösung mischen. Substrat ist lichtgeschützt nur ca. 30 min haltbar – färbt sich).

4. Waschen

MTP ausleeren und auf Schwammtuch ausschlagen, 3 x mit Waschlösung auffüllen, leeren und auf Schwammtuch ausschlagen (gleichmässige Temperatur von Waschlösung und MTP beachten). Mit Waschgerät 3 Waschzyklen. *Reinigen*: Rückseite der MTP mit Papiertuch trocknen und auf optische Verunreinigungen prüfen.

5. Substrat

100 µl Substrat in jedes Mikroröhrchen pipettieren. *Mischen*: MTP auf Schüttler kurz mischen.

6. Entwickeln

10–20 min bei RT, möglichst lichtgeschützt, evtl. unter leichter Bewegung entwickeln (Taumler) und Farbentwicklung verfolgen.

AbleSEN der Resultate

1. *Semiquantitative Bestimmungen – AbleSEN der Extinktionen mit blosser Auge*
Die Färbung des Substrats in den MR kann von blosser Auge abgelesen werden. Um den Analytgehalt abzuschätzen, wird die Intensität der Färbung der Proben mit den Standards verglichen (Tabelle 2).

2. Quantitative Bestimmungen – Messen der Extinktion mit Reader

Die Anfärbung des Substrats (blaugrün) wird mit dem Reader verfolgt, dazu wird die MTP bei 630 nm bis zum Abstoppen in Intervallen durchgemessen.

Stoppen: mit 100 µl Stopplösung wird die Farbentwicklung gestoppt – durch die pH-Änderung erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Erreicht die Farbentwicklung bei 630 nm eine Extinktion von 0,25–0,35 (normalerweise nach 10–20 min), so kann sie abgestoppt werden, da die Extinktion bei 450 nm ca. 3 x höher ist.

Messen: MTP wird bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Die Messung im Dual-Modus, d. h. mit einer Referenzwellenlänge, soll optische Verunreinigungen der MTP oder durch Ausfällungen im Substrat eliminieren, da diese Verunreinigungen unabhängig von der Wellenlänge sind.

Tabelle 2. Visuelle Beurteilung der Intensität der Substratfärbung und approximativer Analytgehalt (Matrixeffekt ≤ 10%)

% Exto	Ablesbarkeit	Bewertung	ng CAP/ml	Standard	ng SMA/ml	Standard
≤ 10	extrem positiv	++++	≥ 3,00		≥ 32,0	
~ 20	stark positiv	+++	~ 1,00	S0	~ 10,0	S1
20–50	deutlich positiv	++	~ 0,30		~ 3,0	
50–60	positiv	+	~ 0,10	S0,1	~ 1,0	S0
60–90	undeutlich positiv	±	~ 0,03		~ 0,3	
> 90	negativ	–	≤ 0,01		≤ 0,1	
100	negativ	–	0		0	

Ergebnisse

Eigenschaften der Testsysteme im Puffer

Variation der Messwerte

Um die Streuung der Testsysteme zu prüfen, wurden 96 Nullwerte (maximale Extinktion, Ext₀) auf einer MTP gemessen und die Streuung um den Mittelwert (100%) untersucht. In Tabelle 3 werden die Häufigkeiten der Abweichungen der Nullwerte vom Mittelwert klassiert dargestellt. Die Messwerte stammen von je einer MTP aus vier verschiedenen Chargen.

Tabelle 3. Häufigkeiten der Abweichungen der Nullwerte ($n = 96$) und der gemittelten Messwerte ($n = 24$ Dreifachbestimmungen) vom Mittelwert in Klassenbreiten von 5% ($s =$ Standardabweichung)

Streubereich	% Einzelwerte (96)				% Mittelwerte (24)	
	SMA-Coat	s	CAP-Coat	s	SMA-Coat	CAP-Coat
> 30	0		1	1	0	0
25–30	0		1	1	0	0
20–25	0		0		0	0
15–20	1	1	1	1	0	0
10–15	4	2	5	5	0	1
5–10	22	3	27	3	4	5
< 5	74	5	67	2	20	18

Chargenprüfung

Jede Charge MTP, die frisch mit AS beschichtet, abgesättigt, gewaschen, verpackt und bei -20°C gelagert worden ist, wird anhand des Nullwerts auf Aktivität und Homogenität der Beschichtung und mit zwei Standards auf Empfindlichkeit geprüft (Tabelle 4).

Nachweisempfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze (statistisch signifikanter Unterschied zum Nullwert bei einer 95%igen Wahrscheinlichkeit im t -Test) des Testsystems für CAP bzw. für SMA liegt zwischen 10–32 pg/ml bzw. zwischen 0,1–0,3 ng/ml. Die mittleren relativen Extinktionswerte der aufgeführten Standards aus 6 bzw. 8 Testansätzen mit je drei Standardkurven sind in den Abbildungen 5 und 6 graphisch dargestellt. Die dazugehörigen Mittelwerte und Variationen der Extinktionen der Standards sind in den Tabellen 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 4. Ergebnis einer Chargenprüfung mit den Randmodulen einer frisch mit SMA-AS beschichteten MTP

	1	2	11	12	1	2	11	12	1	2	11	12	
A	Bl	->	0	0	0,00	0,00	1,08	1,13	0	0	0	0	
B	0	0			1,11	1,11	1,09	1,10	98	102	103	97	∅0
C					1,07	1,10	1,08	0,91	5	1	2	10	V%
D					1,01	1,10	1,12	1,07					
E	S0,5	S-0,5	S0,5	S-0,5	0,29	0,74	0,30	0,77	S0,5	S-0,5	S0,5	S-0,5	
F					0,28	0,72	0,30	0,75	26	67	27	70	∅S
G					0,27	0,73	0,28	0,74	3	3	6	3	V%
H					0,29	0,69	0,27	0,71					

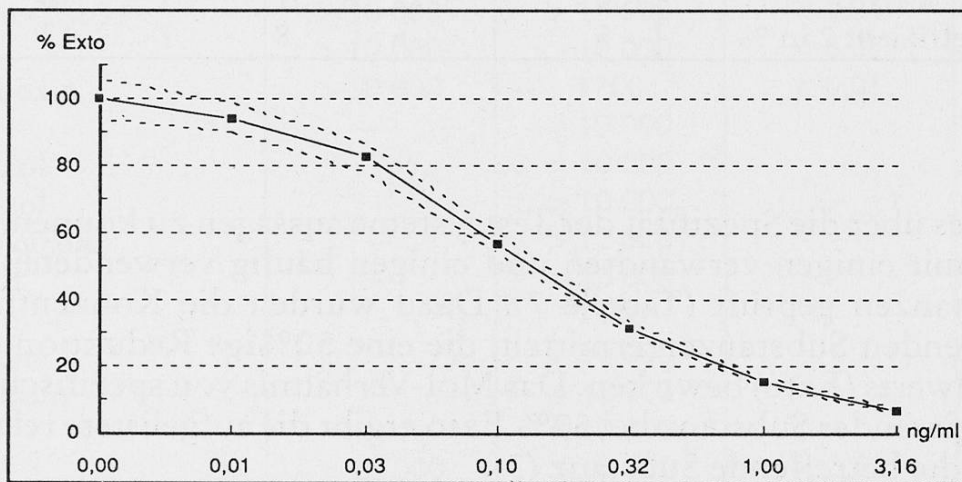


Abb. 5. Standardkurve mit Variationsbereich ($\pm V1 \% = \frac{s}{\text{Exto}} \times 100$) für CAP-Testsystem

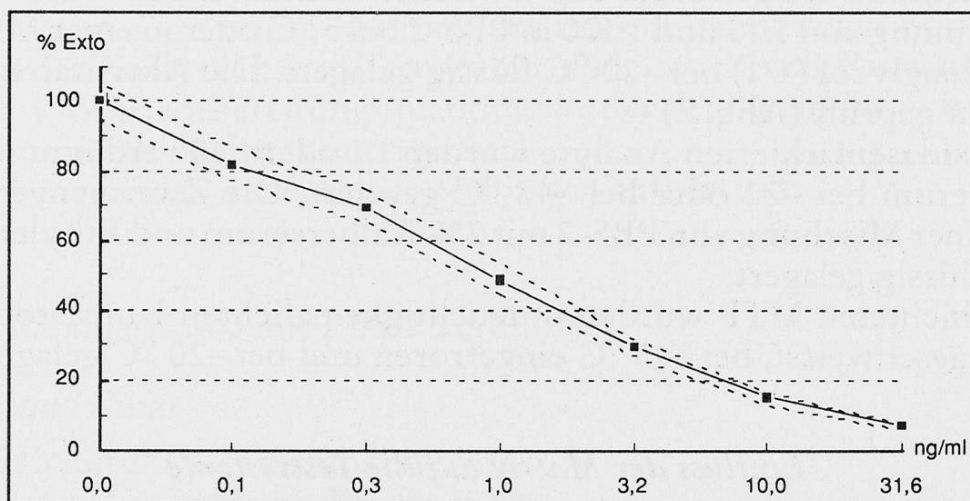


Abb. 6. Standardkurve mit Variationsbereich ($\pm V1 \% = \frac{s}{\text{Exto}} \times 100$) für SMA-Testsystem

Tabelle 5. Mittelwerte und Variationen ($V2 = \frac{s}{\text{Exts}} \times 100$) der Extinktionen der Standards von 8 MTP mit je 9 Wiederholungen pro Standard

Standards in ng CAP/ml	Exto	0,01	0,03	0,10	0,32	1,00
Mittelwert in % Exto	100	95	83	57	32	16
Variationskoeffizient 2 in %	6	5	6	6	6	9

Tabelle 6. Mittelwerte und Variationen ($V2 = \frac{s}{\text{Exts}} \times 100$) der Extinktionen der Standards von 8 MTP mit je 9 Wiederholungen pro Standard

Standards ng SMA/ml	Exto	0,3	1	3	10	32
Mittelwert in % Exto	100	72	51	31	16	7
Variationskoeffizient 2 in %	5	6	8	7	12	22

Spezifität

Um einiges über die Spezifität der Testsysteme aussagen zu können, wurden die Reaktionen mit einigen verwandten und einigen häufig verwendeten antimikrobiellen Substanzen geprüft (Tabelle 7). Dazu wurden die Konzentrationen der kreuzreagierenden Substanzen ermittelt, die eine 50%ige Reduktion der Extinktion des Nullwerts (Exto) bewirken. Das Mol-Verhältnis von spezifischem Antigen zu kreuzreagierender Substanz bei 50% Exto ergibt die aufgelistete relative Kreuzreaktion für die betreffende Substanz (3).

Lagerung der Antiseren und markierten Analyte

Die Antiseren wurden vor dem Einfrieren sterilfiltriert, portioniert und bei $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ unverdünnt tiefgefroren. Als Zwischenverdünnungen wurden die AS in einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 in PBS-2 bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in einer Mischung von PBS-2 Ethylenglycol (1/1) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ flüssig gelagert. Die Aktivität wurde nach 2 Jahren erneut geprüft (Abb. 7).

Die peroxidase markierten Analyte wurden 1:1 oder 1:10 verdünnt in PBS-2 mit 2% Kälberserum bei -20 oder bei $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zwischenverdünnungen wurden in einer Mischung von PBS-2 mit 2% Kälberserum und Ethylenglycol (1/1) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ flüssig gelagert.

Die beschichteten MTP wurden in feuchtigkeitsdichten Kunststoffolien unter Vakuum eingeschweisst, bei $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Einfluss der Matrix auf die Testsysteme

Werden die Analyte in einer flüssigen, gut pipettierbaren Lebensmittelmatrix bestimmt, so muss mit einem Einfluss der Matrix gerechnet werden, d. h. die

Tabelle 7. Kreuzreaktionen mit verwandten und anderen antimikrobiellen Substanzen (Konzentration bei 50% Exto und in % CAP und % SMA (Mol-Verhältnis))

Antiserum (AS) Exto Substanz	CAP-AS 50% ng/ml	SMA-AS 50% ng/ml	CAP-AS Kreuzreaktion % (CAP)	SMA-AS % (SMA)
<i>Chloramphenicol (CAP)</i>	0,17	> 10 000	100	< 0,01
<i>CAP-Glucuronid</i>	0,65	–	40	–
<i>Chloramphenicol Base</i>	20	–	2	–
<i>Sulfadimidin (SMA)</i>	10 000	1	< 0,01	100
<i>N4-Acetyl-sulfadimidin</i>	–	1	–	85
<i>Sulfamerazin</i>	–	41	–	2
Gentamycin	> 10 000	–	< 0,01	–
Sulfamethoxy-pyridazin	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfachlorpyridazin	10 000	> 10 000	< 0,01	< 0,01
Sulfachlozin (Esb3)	> 10 000	> 10 000	< 0,01	< 0,01
Sulfadiazin	> 10 000	> 10 000	< 0,01	< 0,01
Sulfadimethoxin	> 10 000	1700	< 0,01	< 0,1
Sulfadoxin	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfamethazol	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfamethazol	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfamethoxazole	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfanilamid	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfapyridin	–	7400	–	< 0,1
Sulfaquanidin	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfaquinoxalin	–	> 10 000	–	< 0,01
Sulfathiazol	–	> 10 000	–	< 0,01
Tetracyclin	> 10 000	> 10 000	< 0,01	< 0,01
Thiamphenicol	> 1000	–	< 0,01	–

Extinktion einer Nullprobe erreicht meistens nicht die Extinktion des Nullwerts im Puffer. Dieser sogenannte Matrixeffekt täuscht damit einen positiven Befund vor. Wie gut der Analyt mit dem Testsystem in Fleisch, Milch, Eiern und Harn ohne aufwendige Probenvorbereitung quantitativ oder semiquantitativ bestimmt werden kann, wurde als nächstes untersucht.

Die Proben wurden dabei folgendermassen aufbereitet:

Harn

- Harn 1:100 oder 1:300 mit PBS-2 verdünnen

Milch roh und erhitzt

- Milch 1:10 mit PBS-2 verdünnen
entfetten nur bei unklaren Ergebnissen

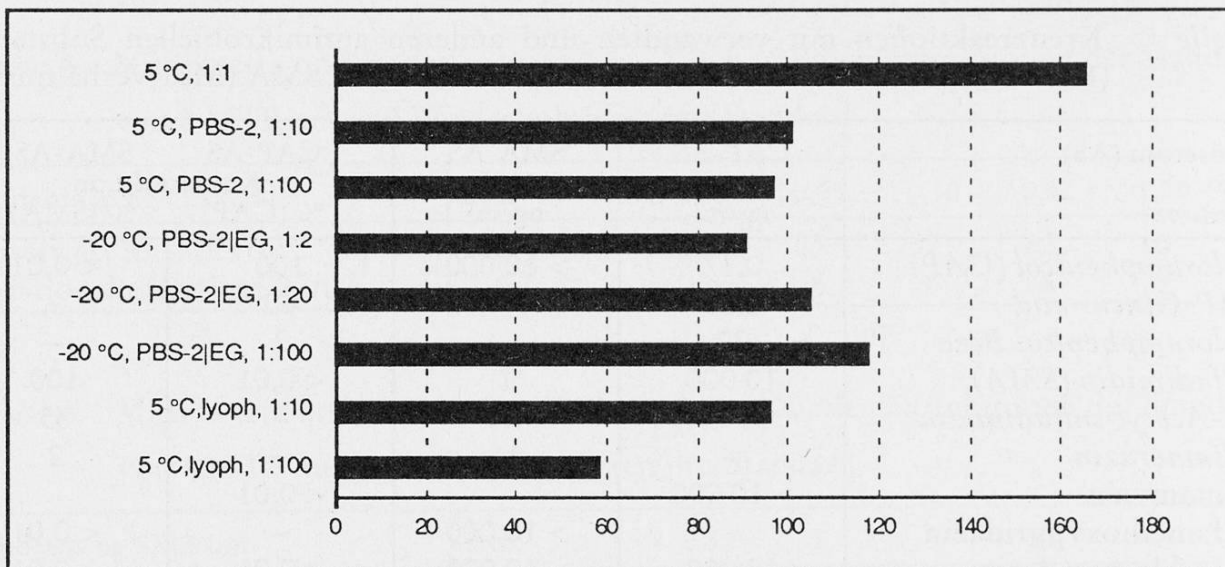


Abb. 7. Reaktionsfähigkeit des Antiserums im CAP-Testsystem nach einer Lagerung von 28 Monaten unter verschiedenen Bedingungen

Ei und Eiprodukte

- rohe Eier im Stomacher 1 min homogenisieren
- homogenisiertes Ei 1:10 (g/ml) mit PBS-2 verdünnen

Muskelfleisch frisch oder gekocht

- 4 g Fleisch ohne sichtbaren Fettanteil in Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 16 ml PBS-2 dazugeben (Verdünnung 1:5)
- mit Polytron gut homogenisieren (ca. 30 s, 10 000 Touren/min)
- Homogenat zentrifugieren, 10 000 g, 10 min, 4 °C
- wässrige Phase durch Wattefilter gewinnen
- Für Screening-Untersuchungen wird die wässrige Phase 1:2 mit PBS-2 weiterverdünnt. Für quantitative Untersuchungen können weitere Verdünnungen eingesetzt werden.

Bemerkungen:

- Vorhomogenisiertes Fleisch oder länger als 1 Tag gelagertes Fleisch kann das Testsystem beeinflussen, deshalb wurde nur frisches oder in frischem Zustand gefrorenes Fleisch verwendet und erst unmittelbar vor der Untersuchung homogenisiert.

Matrixeffekt von aufbereiteten Proben auf das Testsystem

In der Praxis wird normalerweise eine grössere Probenzahl zusammen untersucht, die mehrheitlich negativ sind. Anhand der negativen Proben kann der Matrixeffekt für die Auswertung einfach ermittelt werden. Er ist die prozentuale Reduktion der Extinktion des Nullwerts im Puffer. In der Tabelle 8 sind Mittelwerte der relativen Matrixeffekte von Proben aus normalen Probenuntersuchungen zusammengestellt, die als negativ eingestuft worden sind.

Vereinzelt sind auch Proben mit abnormalen Matrixeffekten (> 50%) vorgekommen.

Tabelle 8. Mittelwerte mit Standardabweichungen von Matrixeffekten aus Untersuchungsserien von normalen Proben (*s* = Standardabweichung, bei Milch wurde der markierte Analyt mit 1%iger Caseinhydrolysatlösung verdünnt)

Lebensmittel	Verdünnung	normaler Matrixeffekt (% Exto)					
		<i>n</i>	SMA	<i>s</i>	<i>n</i>	CAP	<i>s</i>
Rohmilch	1:10	188	37	3	110	34	3
erhitzte Milch	1:10	32	30	12	55	22	15
Vollei	1:10	220	36	8	278	30	10
Muskelfleisch	1:10	20	24	11	32	24	11
Mittelwerte	1:10		31	10		28	10

Einfluss der Matrixverdünnung

Je höher eine Matrix verdünnt wird, umso geringer ist normalerweise der Matrixeffekt. Um geeignete Verdünnungen für die Testsysteme auswählen zu können, wurde die Matrix in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt und der Matrixeffekt bestimmt (Tabelle 9).

Tabelle 9. Matrixeffekt von Fleisch, Eier, Milch und Harn bei diversen Verdünnungen (Variationskoeffizient = 5–10%, bei Milch wurde der markierte Analyt mit 1%iger Caseinlösung verdünnt)

Matrix	Verdünnung/ EIA	0	1:5	1:10	1:20	1:30/50*	1:100	1:300
Fleisch	SMA	0	67	54	43	35	19	
	CAP	0	25	16	10	6	0	
Eier	SMA	0	30	31	29	19*	12	
	CAP	0	43	41	30	23	9	
Milch	SMA	0	10	5	0	0	0	
	CAP	0	5	0	0	0	0	
Harn	SMA	0					28	12
	CAP	0					12	0

Matrixeffekt und Zusatz

1. Standardkurve im Puffer und in der Matrix

Die Extinktionen der Standardzusätze wurden im Puffer und in aufbereiteten Proben-Matrixen bestimmt, um die Abhängigkeit der Extinktionen in der Matrix von denen im Puffer zu studieren. Wenn die Werte im Puffer von Tabelle 10

mit dem Faktor 0,7 multipliziert werden, so erhält man die korrigierten Werte. Der Korrekturfaktor wird erhalten, indem der Matrixeffekt (30% = 0,3) von 1 subtrahiert wird. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung in der Matrix einer aufbereiteten Fleischprobe sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10. Extinktionen der Standards im Puffer und in der Matrix einer aufbereiteten Fleischprobe sowie die berechneten (korrigierten) Extinktionen: $\text{korr. Wert} = \text{Ext}_{\text{Pu}} \times (1 - \text{ME})$, Matrixeffekt (ME) = 0,3

CAP pg/ml	Puffer % Exto	Fleisch % Exto	korr. Werte ME 30%
1000	18	12	12
316	31	25	22
100	60	43	42
32	80	58	56
0	100	68	70

2. Zusatz zu Probenextrakten

Wenn einzelne Proben mit und ohne Standardzusatz bestimmt werden, kann die Übereinstimmung der relativen Extinktionsdifferenzen in der Matrix und im Puffer im jeweiligen Testansatz überprüft werden. Extinktionswerte aus Routineuntersuchungen sind in der Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11. Extinktionen (% Exto) von Nullwert und Zusatz (100 pg CAP/ml) in Puffer und in einer Anzahl aufbereiteter Proben (n), sowie gemessene und berechnete Hemmungen für diesen Zusatz (s = Standardabweichung, Testsystem für CAP)

Medium	n	Nullwert Ø Ext	s	ME Ø Ext	100 ppt Ø Ext	s	100 ppt gemessen	s	Hemmung berechnet	s
Puffer		100		0	57	6	43		–	
Fleisch	22	76	11	24	38	5	48	3	45	4
Milch	10	66	4	34	38	2	39	5	36	3
Eier	51	69	10	30	40	5	42	5	36	7

Quantitative Bestimmung in aufbereiteten Proben

Bestimmungen mit zwei Standardwerten

Durch eine Vierfachbestimmung der zwei Standardwerte und durch eine Acht-fachbestimmung des Nullwerts kann die normale Funktion des Tests (Variation, Nullwert und Empfindlichkeit) überprüft werden. Die Proben, z. T. mit Zusatz, werden doppelt bestimmt, um mehr Proben pro Testansatz auf einer MTP untersuchen zu können (siehe dazu Abb. 1).

Anhand der Extinktionswerte von offensichtlich negativen Proben kann der Matrixeffekt ermittelt und durch eine Anzahl Proben mit Zusatz kontrolliert werden.

Aus der Extinktion einer Probenverdünnung wird mit der Regressionsgleichung für die Gerade durch die beiden korrigierten Extinktionen der Standardkurve der Analytgehalt berechnet. Um den endgültigen Analytgehalt der Probe zu erhalten, muss noch mit dem Faktor der Probenverdünnung multipliziert werden.

Positiv reagierende Proben, deren Extinktion nicht zwischen den Standardwerten liegt, müssen entsprechend verdünnt werden und mit Zusatz in einem Test mit Standardkurve nochmals untersucht werden.

Bestimmungen mit Standardkurve

Im Unterschied zur Bestimmung mit zwei Standardwerten lässt sich durch die grössere Anzahl Standards der Kurvenverlauf verfolgen. Die Proben werden vierfach mit und ohne Zusatz bestimmt, wobei die Randwerte nicht in die Berechnung der Mittelwerte einbezogen werden. Bekannte Nullproben mit und ohne Zusatz werden mitbestimmt (siehe dazu Abb. 2).

Der Analytgehalt in der Probenverdünnung wird mit der korrigierten entsprechenden Regressionsgleichung berechnet. Für die Berechnung des Analytgehaltes aus der Extinktion der Proben sollen nur Regressionsgleichungen verwendet werden, die aus Punkten stammen, die im quasi linearen Bereich der Standardkurve liegen. Um den endgültigen Analytgehalt der Probe zu erhalten, muss noch mit dem Faktor der Probenverdünnung multipliziert werden.

Präzision der Quantifizierung und Wiederfindungsrate in der Matrix

Durch wiederholte Messung der gleichen Probe in einem Testansatz (Intraassay) und in verschiedenen Testansätzen (Interassay) können Werte für die Präzision, die Reproduzierbarkeit und die Wiederfindungsrate einer immunchemischen Analyse ermittelt werden (3). Proben von Fleisch, Milch und Eiern mit drei verschiedenen Zusätzen um den Grenz- bzw. Toleranzwert wurden dreimal pro Testansatz in drei Testansätzen am Morgen und am Nachmittag bestimmt. Jede Probe mit Zusatz wurde insgesamt 18mal bestimmt, und zwar mit Dreifachbestimmung. Aus den Ergebnissen dieser Präzisionsbestimmungen wurde der Gesamtmittelwert, der Intraassay-, der Interassay-Variationskoeffizient ($VK \% = (\text{Varianz}^{1/2} / \text{Gesamtmittelwert}) \times 100$) und die Wiederfindungsrate ermittelt (Tabellen 12 und 13).

Diskussion

CAP und SMA werden nicht nur im Ausland (1), sondern auch in der Schweiz in der Tierhaltung häufig eingesetzt, wie Harnuntersuchungen an Schlachthöfen gezeigt haben. Viele Tierarzneimittel gegen Infektionskrankheiten beinhalten diese

Table 12. Richtigkeit, Variationskoeffizienten (VK %) und Wiederfindungsraten bei der Bestimmung von CAP (n = Anzahl Dreifachbestimmungen)

Zusatz	Gesamtmittelwert			Intra-/Interassay VK (%)			Wiederfindungsrate (%)		
	Fleisch ($n = 18$)	Milch ($n = 18$)	Eier ($n = 18$)	Fleisch	Milch	Eier	Fleisch	Milch	Eier
0,8	0,46	0,65	0,57	13/13	10/7	13/11	57	82	71
1,2	0,68	1,09	0,94	17/18	15/13	12/11	57	91	78
3,0	1,85	3,06	2,63	12/8	10/8	10/11	62	102	88

Table 13. Richtigkeit, Variationskoeffizienten (VK %) und Wiederfindungsraten bei der Bestimmung von SMA (n = Anzahl Dreifachbestimmungen)

Zusatz	Gesamtmittelwert			Intra-/Interassay VK (%)			Wiederfindungsrate (%)		
	Fleisch ($n = 18$)	Milch ($n = 18$)	Eier ($n = 18$)	Fleisch	Milch	Eier	Fleisch	Milch	Eier
30	20	31	23	19/21	11/11	13/23	71	102	78
80	60	86	60	9/12	11/7	11/20	79	107	75
120	98	120	94	14/9	18/6	11/8	81	100	78

Wirkstoffe, wie aus der neusten Tierarzneimittelliste der Kantonalen Heilmittelkontrolle Zürich (14) ersichtlich ist.

Mit den mikrobiellen Hemmstofftests werden diese beiden Substanzen erst oberhalb der zugelassenen Höchstkonzentration erfasst (3). Deshalb wurden bereits vor zehn Jahren für CAP und SMA immunchemische Testverfahren in Form von Radio- (5, 10, 6) und Enzymimmunoassay (8, 3, 7, 12, 2) entwickelt, die einen schnellen und spezifischen Nachweis von CAP und SMA in tierischen Lebensmitteln erlauben. Als Folge dieser Entwicklungen werden seit wenigen Jahren EIA in Form von Kits käuflich auf dem Markt angeboten.

Mit Hilfe der Veröffentlichungen (3, 2) gelang es, eigene Immunreagenzien für diese EIA zu erzeugen. Schon einige Wochen nach der 1. Boosterung der immunisierten Kaninchen konnten Antiseren mit hohem Titer gegen CAP und SMA gewonnen werden. Das Antiserum gegen SMA erreichte allerdings erst 11 Wochen nach der 1. Boosterung ein Maximum (Abb. 2). Dank dem hohen Gehalt an spezifischen AK können die rohen Antiseren 1:30 000 bis 1:50 000 in PBS verdünnt direkt für die Beschichtung der Mikroröhrchen verwendet werden.

Die Aktivität der AK und der markierten Analyte blieb unter verschiedenen Lagerbedingungen recht stabil (Abb. 8). Beim Lyophilisieren der AS als Beschichtung oder als Verdünnung ($> 1:10$) konnten jedoch deutliche Aktivitätsverluste beobachtet werden. Die Beschichtung bei Mikroröhrchen blieb in abgesättigtem,

gewaschenem und vakuumverpacktem Zustand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Monate stabil. Diese einfachen Lagerbedingungen erlauben es, die Tests einige Zeit zum voraus auf die Bedürfnisse abgestimmt vorzubereiten.

Die Aktivität, Streuung und Empfindlichkeit der Testsysteme kann anhand der absoluten Extinktion und Variation der Nullwerte und der Hemmung durch die beiden beim Screenen verwendeten Standards kontrolliert werden. Die Abweichungen der Nullwerte vom Mittelwert liegen normalerweise unter 10%, vereinzelte Ausreisser müssen jedoch akzeptiert werden (Tabelle 3). Die Spezifikationen in den Tabellen 3, 4, 5 und 6 dienen als Kriterium, ob der Test richtig und mit der nötigen Sorgfalt durchgeführt worden ist.

Die Nachweisempfindlichkeit und die Spezifität der Testsysteme sind mit den bereits veröffentlichten vergleichbar (1, 3).

Immunochemische Analysemethoden sind dann geeignet, wenn grosse Probenzahlen in kurzer Zeit mit vertretbarem Aufwand im ppb-Bereich zu sichten sind. Da falsch negative Ergebnisse sehr unwahrscheinlich sind, eignen sie sich hervorragend für derartige Screening-Untersuchungen. Wird dem EIA eine aufwendige Probenvorbereitung vorgeschaltet, um ein Analyseergebnis mit einer für instrumental-analytischen Methoden üblichen Genauigkeit und Sicherheit zu erhalten, so kommt die Stärke solcher Tests nicht richtig zum Tragen. Die Aufarbeitung der Proben ist dann oft der limitierende Faktor für den Probenumfang. Deshalb wurde untersucht, wieweit Milch, Fleisch und Eier aufgearbeitet werden müssen, damit die Analyte semiquantitativ nachgewiesen werden können und mit welcher Genauigkeit durch eine matrixabhängige Korrektur der Extinktionen der Standards im Puffer die Analyte auch in der aufbereiteten Matrix quantitativ bestimmt werden können. Es versetzt immer wieder in Staunen, bei welchem Probenanteil in einer minimal aufbereiteten Probe die Analyte bis in den ppt-Bereich durch die Antikörper spezifisch erfasst werden. Schon ab einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10 ist der Einfluss der Matrix relativ gering und im Testansatz selber genügend konstant. Je höher die Matrix verdünnt wird, umso geringer ist der Matrixeffekt (Tabelle 9). Für die Screening-Untersuchungen wurde die Verdünnung 1:10 gewählt, weil mit beiden Testsystemen die Analyte genügend empfindlich erfasst werden und mit dieser Verdünnung meistens eine wesentliche Reduktion des Matrixeffekts verbunden ist (11).

Aus noch ungeklärten Gründen kann der Mittelwert der Matrixeffekte für die gleiche Matrixart zwischen einzelnen Untersuchungsserien schwanken. Im gleichen Testansatz ist er jedoch genügend konstant, um die Messungen auswerten und die Proben klassieren zu können. Schon mit einer minimalen Probenvorbereitung lassen sich Milch, Fleisch und Eier, wenn der Einfluss der Matrix auf die Testsysteme ermittelt worden ist, mit der erforderlichen Empfindlichkeit sichten. Bei fraglichen Proben, die meist weniger als 5% ausmachen, kann eine zweite quantitative Bestimmung mit Zusatz durchgeführt werden. Ein abnormaler Matrixeffekt wird meistens durch den Vergleich der Extinktionen von Proben mit und ohne Zusatz erkannt. Reduziert nämlich der Zusatz bei solchen Proben die Extinktionen im «gleichen» Masse wie im Puffer, so können sie als falsch positiv ausgeschieden werden. Es bleiben erfahrungsgemäss nur sehr wenige Proben übrig, die eine

Bestätigung mit einer Referenzmethode für amtliche oder gerichtliche Massnahmen erfordern.

Wie die Ergebnisse aus den Bestimmungen der Präzision und Wiederfindungsrate zeigen, kann mit der quantitativen Bestimmung der Analytgehalt auch in einer minimal aufbereiteten Probe ziemlich genau bestimmt werden (Tabellen 12 und 13). Bei Milch, Fleisch und Eier verhalten sich die Extinktionen der Standards im Puffer und in den aufbereiteten Proben proportional zueinander. Die korrigierten Eichpunkte für die Regressionsgeraden in der Matrix lassen sich anhand der Werte im Puffer und des Matrixeffekts berechnen (Tabellen 10 und 11). Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten liegen mit 10–25% im normalen Rahmen von Untersuchungen mit EIA (3). Die Wiederfindungsrate und die Präzision genügen, um die Proben quantitativ ziemlich genau klassieren zu können. Die hochempfindlichen und spezifischen Testsysteme, die normalerweise im Labor zum Einsatz kommen, funktionieren auch unter den rauen Bedingungen eines Feldlabors im Schlachthof. Die Eigenschaften der Antiseren erlauben es, die Testzeit so kurz einzustellen, dass eine Harnkontrolle direkt ab Band möglich wurde. Bereits 45 min ab Untersuchungsbeginn sind kritische Analytkonzentrationen im Harn, die auf nicht erlaubte Rückstände im Fleisch hinweisen, von blossen Auge einwandfrei zu erkennen. Aufgrund der Harnbefunde können kritische Schlachtkörper rechtzeitig erkannt und mit begründetem Verdacht vorsorglich beschlagnahmt werden, bis das Ergebnis einer instrumental-analytischen Untersuchung vorliegt. Es ist vorgesehen, einige Ergebnisse solcher Untersuchungen in grösseren Schlachthöfen in einer weiteren Arbeit zu veröffentlichen.

Schlussfolgerungen

Immunchemische Analysemethoden lassen sich recht gut auf eine wirkungsvolle Untersuchungsstrategie für Rückstandskontrollen abstimmen. Wenn bei einer EIA-Methode nicht das Ziel verfolgt wird, sie als eine präzise quantitative Methode zu trimmen, kann in Kontrollaufgaben ihre eigentliche Stärke voll ausgenutzt werden, nämlich, in kurzer Zeit, auch bei einem grossen Probenumfang, die Positiven im kritischen Bereich mit einem vertretbaren Aufwand zu sichten. Es lohnt sich bei der Analyse von Lebensmitteln mit EIA abzuklären, wieweit eine Probe aufgearbeitet werden muss, um das Ziel der Kontrolle zu erreichen. Oft lässt sich bereits in minimal aufgearbeiteter Probenmatrix erstaunlich empfindlich, spezifisch und präzise messen. Ist für einen Analyten eine immunchemische Methode vorhanden, so rechtfertigt sich normalerweise der grosse Untersuchungsaufwand von instrumental-analytischen Methoden nur, wenn bei einer Probe die zulässige Höchstkonzentration deutlich überschritten ist, so dass eine amtliche Verfügung oder eine richterliche Urteilung notwendig wird. Beim Nachweis mit EIA muss mit falsch positiven Befunden gerechnet werden, besonders wenn die Proben minimal aufbereitet wurden. Durch eine zweite Bestimmung mit Zusatz können die meisten falsch positiven Proben erkannt werden. Die immunchemischen Ana-

lysemethoden konkurrenzieren die instrumental-analytischen Methoden nicht grundsätzlich, sondern ergänzen sie in ausgezeichneter Weise.

Dank

Frau *Monika Risel* danken wir für die Mitarbeit bei der Herstellung der Immunogene und markierten Analyte.

Zusammenfassung

Zwei modifizierte Testsysteme zum Prüfen von Milch, Fleisch und Eiern auf Chloramphenicol und Sulfadimidin (Sulfamethazin) wurden entwickelt. Der einfache Testablauf, die ausserordentlich kurze Testzeit (45 min) und die gute Ablesbarkeit von blossen Auge erlauben sogar vor Ort an Schlachthöfen Harn zu screenen. Nachweisempfindlichkeit, Spezifität und Präzision sind mit den bereits publizierten Enzymimmunoassays im Einklang. Durch das Einbeziehen des Matrixeffekts in die Berechnung konnte in minimal aufbereiteten Proben mit der notwendigen Empfindlichkeit gemessen werden. Als Ursachen von vereinzelt, falsch positiven Reaktionen konnten abnormale Matrixeffekte ermittelt werden. Erfahrungsgemäss bleiben wenige fragliche Proben übrig, die eine instrumental-analytische Untersuchung erfordern.

Résumé

Deux systèmes de test modifiés ont été développés pour contrôler, si le lait, la viande et les œufs contiennent du chloramphénicol et de la sulfadimidine (sulfaméthazine). Le procédé simple, la courte durée du test (45 min) et le constat à vue d'oeil permettent de faire le test sur l'urine même dans l'abattoir. La sensibilité, spécificité et précision sont comparables aux immunoassays déjà publiés. En considérant l'effet de matrice dans le calcul, la détermination ne demande qu'un minimum de préparation des échantillons. Lors de certaines réactions positives fausses, on a pu observer des effets de matrices anormales. Les expériences montrent que pour quelques échantillons uniquement, une analyse instrumentale supplémentaire était nécessaire.

Summary

Two modified test systems were developed for screening chloramphenicol and sulfadimidine (sulfamethazine) in milk, meat, and eggs. Simplicity of the procedure, the short testing time (45 min), and readability by eye enable screening of urine samples in the slaughter-house. Sensitivity, specificity, and precision are comparable to immunoassays previously described. As the matrix effect is considered in the calculation, determinations require a minimum of sample clean-up. The few false positive results were found to be caused by abnormal matrix effects. Experience showed that only few questionable samples are left for further analysis by instrumental analysis.

Literatur

1. *Schweikert, F. A.*: Immunchemische Verfahren zum Nachweis von niedermolekularen Substanzen als Rückstände in Lebens- und Futtermittel. Dissertation aus der Tierärztlichen Fakultät der Universität München 1991.
2. *Meier, R.*: Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Sulfonamiden in Milch. Dissertation aus der Tierärztlichen Fakultät der Universität München 1991.
3. *Märtlbauer, E.*: Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1993.
4. *Märtlbauer, E. und Terplan, G.*: Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch. Arch. Lebensmittelhyg. **38**, 3–7 (1987).
5. *Arnold, D. vom Berg D., Boertz, A. K., Mallick, U. und Somogy, A.*: Radiologische Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern. Arch. Lebensmittelhyg. **35**, 131–135 (1984).
6. *Campbell, G. S., Mageau, R. P., Schwab, B. and Johnston, R. W.*: Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay. Antimicrob. Agents Chemother. **25**, 205–211 (1984).
7. *Dixon-Holland, D. E. and Katz, S. E.*: Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 1137–1140 (1988).
8. *Fleeker, J. R. and Lovett, L. J.*: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening sulfamethazine residues in swine blood. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 172–174 (1985).
9. *Hock, C. und Liemann, F.*: Die Entwicklung eines Radioimmunoassays zum Nachweis von Chloramphenicol und 3'-Chloramphenicol-Beta-D-Monoglucuronid. Arch. Lebensmittelhyg. **36**, 138–142 (1985).
10. *Notermans, S., Wenars, K. and Dufrenne, J.*: Recognition of false positive results obtained with immunoassay by analysing the reaction kinetics. Food Agric. Immunology **3**, 85–92 (1991).
11. *Van de Water, C. N., Haagsma, N., Van Kooten, P. J. S. and Van Eden, W.*: An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of chloramphenicol using a monoclonal antibody. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **185**, 202–207 (1987).
12. *Niederschlag, E., Kley, H.K. und Usadel, K.-H.*: Production of steroid antisere in rabbits. In: Cameron, E.D.H., Hillier, S.G. and Griffith, K., Steroid immunoassays proceedings of the 5th Tenovus Workshop, p. 87–96. Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales 1975.
13. *Müller, W.*: Tierarzneimittel-Liste, 6. Auflage. Kantonale Heilmittelkontrolle Zürich, 1993.

Dr. Karl Strebel
Nicole Schneider
Kantonales Laboratorium Zürich
Postfach
CH-8030 Zürich