

Aus dem Zentrum für Lebensmittelwissenschaften
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Entwicklung eines Modells zur Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit
von gebundenen Tetracyclin-Rückständen und
Anhydrotetracyclin**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Silke Mehlhose-Koch / Geborene Mehlhose
aus Herford

Hannover 2006

Wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. M. Kühne

1. Gutachter: PD Dr. M. Kühne
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Kietzmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2006

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Dr. Eberhard Lienhop
Stiftung

Meiner Familie,
insbesondere meinen lieben Söhnen Daniel und Tobias
in Dankbarkeit gewidmet

1	Einleitung	13
2	Wissenschaftliches Schrifttum	15
2.1	Tetracycline	15
2.1.1	Herkunft und Strukturformel	15
2.1.2	Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum	16
2.1.3	Pharmakokinetik	16
2.1.4	Anwendung in Veterinär- und Humanmedizin	17
2.1.5	Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte	18
2.1.6	Mechanismen der Resistenzentwicklung und Resistenzsituation	20
2.2	Rückstände von Tetracyclinen in Lebensmitteln	22
2.2.1	Risikoabschätzung	22
2.2.2	Bisherige Untersuchungen über Resistenzinduktionen durch Rückstände von Tetracyclinen in Tierkörpern	25
2.2.3	Rechtliche Normen	26
2.2.4	Einlagerung in Knochen	28
2.2.5	Risikoabschätzung gebundener Tetracyclin-Rückstände in Knochen	30
2.2.6	Hitzestabilität gebundener Tetracyclin-Rückstände in Knochen	33
2.2.7	Nachweisverfahren für Tetracycline	35
2.3	Zusammenfassende Bewertung des wissenschaftlichen Schrifttums	36
3	Material und Methoden	37
3.1	Herstellung von Knochenmehl aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln	37
3.1.1	Aufarbeitung der Proben für die High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	38

3.1.2	HPLC-Untersuchung	40
3.2	Modell zur Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclin-Rückständen und Anhydrotetracyclin aus dem mittels HPLC untersuchten Knochenmehl	42
3.2.1	Versuchstiere	42
3.2.2	Haltung und Fütterung der Versuchstiere	42
3.2.3	Einteilung der Versuchsgruppen und Gewinnung des Probenmaterials	43
3.2.4	Versuchsende	44
3.3	MHK-Wert-Bestimmung für Tetracyclin bei <i>E. coli</i> aus Mäusekot	44
3.3.1	E-Test®	45
3.3.2	Aufarbeitung des Probenmaterials	45
3.4	Bestimmung der Tetracyclin- und Anhydrotetracyclinegehalte in Mäuserin, Mäusekot und Mäuseknochen mittels LC-ESI-MS-MS	50
3.4.1	Aufarbeitung des Probenmaterials	50
3.4.2	Durchführung der LC-ESI-MS-MS	51
3.5	Statistische Auswertung der Ergebnisse	56
4	Ergebnisse	59
4.1	Tetracyclin-Gehalte von im Labor hergestellten Knochenmehl	59
4.1.1	Mittlere Wiederfindungsraten der angewendeten Methoden	59
4.1.2	Ergebnisse der Tetracyclinbestimmung aus dem Knochenmehl	59

4.2	Tetracyclin- und Anhydrotetracyclinegehalte in Mäuseurin, Mäusekot und Mäuseknochen	63
4.2.1	TC-, CTC- und ATC-Konzentrationen in Mäuseurin	63
4.2.2	Futteraufnahme-Mengen der Versuchstiere aus Gruppe A	68
4.2.3	Ermittlung des Anteils des über den Urin ausgeschiedenen Tetracyclins an der aufgenommenen / applizierten Menge	69
4.2.4	Vergleich der TC-Ausscheidung der Gruppe A und C bezogen auf die pro Woche aufgenommene Menge TC und auf die insgesamt aufgenommene Menge TC	74
4.2.5	Vergleich der über den Urin erfolgten Ausscheidung von ATC (Gruppe D) im Vergleich zu der Ausscheidung von TC (Gruppe C)	76
4.2.6	Statistische Auswertung der mittels LC-ESI-MS-MS festgestellten TC-Gehalte im Mäuseurin	76
4.2.7	Tetracyclin-, Chlortetracyclin und Anhydrotetracyclinegehalte in Mäuseknochen und Mäusekot	82
4.3	MHK-Wert-Bestimmung für Tetracyclin bei <i>E. coli</i> aus Mäusekot	84
5	Diskussion	91
5.1	Diskussion der Methodik	91
5.1.1	Herstellung des Knochenmehls	91
5.1.2	Aufarbeitung des Knochenmehls für die HPLC-Untersuchung	92
5.1.3	Haltung der Versuchstiere und Gewinnung des Probenmaterials	92
5.1.4	Aufarbeitung der Urin-, Knochenmehl-, Oberschenkel- und Kotproben für die LC-ESI-MS-MS-Analyse	92
5.1.5	Bestimmung der MHK-Werte für <i>E. coli</i> -Isolate	93

5.2	Diskussion der Ergebnisse	93
5.2.1	Bestimmung der Tetracyclin-Gehalte im Knochenmehl	93
5.2.2	Ermittlung der Tetracyclin-Konzentrationen in Urin, Oberschenkelknochen und Kot der Versuchstiere	94
5.2.3	Mikrobiologische Untersuchung zur Feststellung der MHK-Werte für Tetracyclin bei <i>Escherichia coli</i> -Isolaten aus Mäusekot	98
5.3	Schlussfolgerungen	99
6	Zusammenfassung	101
7	Summary	103
8	Schrifttumsverzeichnis	105
9	Anhang	119
9.1	Übersicht über die Wiederfindungsraten von Tetracyclinen in Knochen	119
9.2	Gewonnene Proben (oral aufgenommene Knochenmehl-, TC und CTC- Mengen sowie Urin- und Kotmengen in g) Tab II-IV	120
9.3	Verzeichnis der Hersteller	137
9.4	Abbildungsverzeichnis	139
9.5	Tabellenverzeichnis	139

Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
®	eingetragenes Warenzeichen
**	zu geringes Probenvolumen
a	Jahr
Abb.	Abbildung
ACTC	Anhydrochlortetracyclin
ADI	acceptable daily intake
Amtsbl.	Amtsblatt
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATC	Anhydrotetracyclin
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
CTC	Chlortetracyclin
CuSO ₄	Kupfersulfat
CVMP	Committee for veterinary medicinal products
d.	der
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinacid
e-ATC	Epi-Anhydrotetracyclin
ECD-Agar	E. coli-Direkt-Agar
E. coli	Escherichia coli
e-CTC	Epi-Chlortetracyclin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
et al.	et alii
e-TC	Epi-Tetracyclin
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
Fa.	Firma
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramm
ges.	gesamt
h	Stunde

H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HFA	human flora-associated
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Hrsg.	Herausgeber
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kV	kilo Volt
l	Liter
L	Liter
LC-ESI-MS-MS	Liquid-Chromatographie-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LD	Letale Dosis
M	molar
mM	Millimolar
Max.	Maximum
mg	Milligramm
min	Minuten
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MHK	minimale Hemmkonzentration
mol/l	Mol pro Liter
MRL	maximum residue limit
MRM	Mechanical Recovered Meat
mündl. Mitteil.	mündliche Mitteilung
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Probenanzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.n.	nicht nachweisbar
N	normal
NaCl	Natrium-Chlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Na ₂ -EDTA	Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat
NaOH	Natronlauge
NOEL	no observed effect level
O	Sauerstoff
OTC	Oxytetracyclin
p	Signifikanzniveau
pH	potentia hydrogenii
Pztl.	Perzentil
R	Rest
s.	siehe
S.	Seite

SAS	Statistical Analysis System
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
Tägl.	täglich
TC	Tetracyclin
TS	Trockensubstanz
U	Umdrehungen
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung
vol.	Volumen
WHO	World Health Organization
Wo.	Woche
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Tetracycline gehören zu den Breitspektrumantibiotika und sind die in der Nutztierpraxis am häufigsten eingesetzten Antibiotika (FEDESA 1998). Diese breite Anwendung hält trotz der schlechten Resistenzlage gegenüber den Tetracyclinen an, wofür vor allem ihr breites Wirkungsspektrum und der niedrige Preis verantwortlich sind (MILLER 1993).

Es ist seit langem bekannt, dass Tetracycline eine starke Affinität zu calciumhaltigen Geweben haben. Dementsprechend findet eine Einlagerung in Knochen statt, die auch nach Ablauf der einzuhaltenden Wartezeiten zum Verzehr von Schlachttieren nachweisbar bleibt (BUYSKE et al. 1960, BRÜGGEMANN et al. 1966). In Untersuchungen an tauglich beurteilten, geschlachteten Tieren konnten KÜHNE et al. (2000) eine hohe Prävalenz von gebundenen Rückständen von Tetracyclinen in Knochen nachweisen.

Im Hinblick auf die bekannte Rückstandsproblematik von Tetracyclinen, insbesondere in Schweineknochen, stellt sich die Frage, inwieweit die an den Knochen gebundenen Tetracycline bei oraler Aufnahme dieser belasteten Knochen sekundär bioverfügbar sind oder ob sich durch die Aufnahme Resistenzen bei im Darm vorkommenden Mikroorganismen entwickeln können.

Ferner besteht die Möglichkeit, dass tetracyclinhaltige Knochenpartikel in die menschliche Nahrungskette gelangen. Hierzu könnte z. B. der Verzehr von maschinell entbeintem Fleisch beitragen, in dem sich je nach Herstellungsverfahren bis zu 5 % Knochenpartikel befinden können (VARNAM u. SUTHERLAND 1995). Auch eine eventuelle Neuzulassung von Tiermehl als Nutztierfutter könnte zur Einbringung der an Knochen gebundenen Tetracycline in die Nahrungskette führen (KÜHNE u. MITZSCHERLING 2004).

Im Jahr 1969 wurde erstmalig eine Risikoabschätzung für Tetracyclin-Rückstände in Knochen geschlachteter Tiere veröffentlicht. Im wissenschaftlichen Schrifttum wurde angenommen, dass gebundene Tetracycline antimikrobiell inaktiv sind und somit kein potentiell Risiko für den Verbraucher darstellen (WHO 1969; STAHLMANN u. LODE

2001). Im Gegensatz dazu stellten KÜHNE und KÖRNER (2001b) in einem In-vitro-Verdauungsversuch fest, dass gebundene Chlortetracyclin-Rückstände zumindest teilweise antimikrobiell aktiv sein können.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem Tiermodell den Verbleib der oral aufgenommenen und an Knochen gebundenen Tetracycline aufzuzeigen und die sekundäre Bioverfügbarkeit sowie eine mögliche Resistenzentwicklung bei *E. coli* im Darm zu überprüfen.

2 Wissenschaftliches Schrifttum

2.1 Tetracycline

2.1.1 Herkunft und Strukturformel

Im Jahre 1947 wurde das Chlortetracyclin (CTC) als erster Vertreter der Familie der Tetracycline bei der Untersuchung von Erdproben entdeckt (LEVY 1992). Es wurde aus Kulturfiltraten von *Streptomyces aureofaciens*, einer Actinomycetenspezies, isoliert. 1949 erfolgte die Darstellung von Oxytetracyclin (OTC) aus *Streptomyces rimosus* (WALTER u. HEILMEYER 1969). Tetracyclin (TC) konnte 1953 einerseits aus Nährlösungen verschiedener *Streptomyces*arten isoliert werden und wurde andererseits als erstes Produkt durch Hydrolyse am Chlortetracyclin chemisch hergeleitet (BLACKWOOD 1985). Zu den klassischen Tetracyclinen gehören CTC, OTC, TC. Daneben steht auch das neuere Doxycyclin für Anwendungen in der Veterinärmedizin zur Verfügung. Es wurde 1962 entdeckt (WIESNER u. RIBBECK 1991).

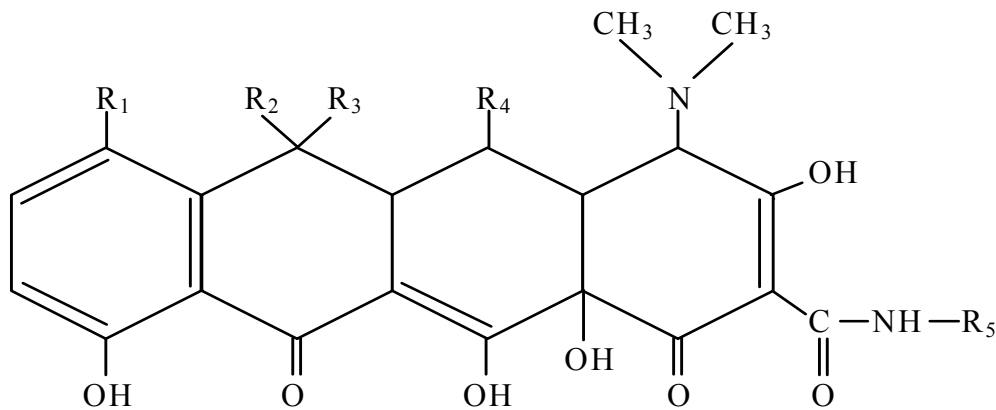


Abb. 1: Allgemeine Grundstruktur der Tetracycline (Formeln nach HLAVKA u. BOOTHE 1985)

Tetracyclin:	Oxytetracyclin:	Chlortetracyclin:	Doxycyclin:	Minocyclin:
R1 = -	R1 = -	R1 = Cl	R1 = -	R1 = (CH ₃)N
R2 = CH ₃	R2 = CH ₃	R2 = CH ₃	R2 = CH ₃	R2 = H
R3 = OH	R3 = OH	R3 = OH	R3 = -	R3 = H
R4 = -	R4 = OH	R4 = -	R4 = OH	R4 = H
R5 = H	R5 = H	R5 = H	R5 = H	R5 = H

2.1.2 Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Tetracycline überwinden die Cytoplasmamembran der Bakterien durch Diffusion sowie aktiven Transport. Die äußere cytoplasmatische Membran wird mittels passiver Diffusion durchdrungen (CHOPRA 1992; THANASSI et al. 1995). An der inneren Cytoplasmamembran der Bakterien kommt es zu einem aktiven Transport der Tetracycline. Diese aktive Aufnahme ist nur bei Bakterienzellen möglich, nicht jedoch bei Säugetierzellen, so dass dies die Wirkungsspezifität und geringe Toxizität der Tetracycline im Einsatz beim Säugetier erklärt (MOSHER u. VINING 1992). Hinzu kommt die Affinität der Tetracycline zu den bakteriellen 70-S-Ribosomen im Gegensatz zu den 80-S-Ribosomen der Säuger, die nur bei Überdosierungen angegriffen werden (STAHLMANN u. LODE 2001). Die Tetracycline hemmen durch ihre Anlagerung an beide Untereinheiten der bakteriellen Ribosomen die Proteinbiosynthese und wirken damit bakteriostatisch (CHOPRA 1985; Kroker et al. 2002). Ihr Wirkungsspektrum reicht von allen Bakterienarten über Mykoplasmen, Chlamydien und Rickettsien bis zu einigen Protozoenarten (STAHLMANN u. LODE 2001).

2.1.3 Pharmakokinetik

Neuere Präparate wie das Doxycyclin können oral aufgrund ihrer hohen Lipophilie sehr gut verabreicht werden und werden dabei zu 90 % resorbiert (STAHLMANN u. LODE 2001). Ältere Tetracycline dagegen werden nach oraler Gabe nur mäßig resorbiert. Die orale Bioverfügbarkeit hängt sehr vom Füllungsstatus des Magens und vor allem von der Art der verabreichten Nahrung ab. Im Magen können alle Tetracycline mit bi- und trivalenten Metallionen aus Nahrung und anderen gleichzeitig verabreichten Präparaten (Milch, Eisenpräparate, Antacida) schwerlösliche Komplexe bilden. Nach der Resorption können sich die Tetracycline durch ihre gute Lipophilie sehr gut im gesamten Körper verteilen und erreichen dabei auch intrazelluläre Erreger. Die Blut-Hirn-Schranke wird allerdings kaum passiert (KROKER et al. 2002). Die Tetracycline werden in ihrer aktiven, nicht metabolisierten Form über die Nieren oder den Darm ausgeschieden, wobei KÜHNE (1995)

bei der Untersuchung von TC- und CTC-positiven Gewebeproben aus Schlachttieren in fast allen Fällen das 4-Epimer der Muttersubstanz nachweisen konnte. (Erläuterung s. unter 2.3.1)

Tab. 1: Pharmakokinetische Daten von Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin (nach KROKER et al. 2002).

Tetracyclin	Enterale Resorption %	Halbwertszeit h	Proteinbindung %	Urinausscheidung %
Tetracyclin	50 (Hund) bis 80 (Mensch)	5 (Hund) 10 (Kalb) 10 (Mensch)	36 (Rind) 70-80 (Hund) 25-55 (Mensch)	56-85 (Hund) 40 (Mensch)
Chlortetracyclin	24 (Hund) 47 (Kalb) 25-30 (Mensch)	5 (Hund) 9 (Kalb) 5-6 (Mensch)	38 (Rind) 61 (Hund) ca. 50 (Mensch)	ca. 20 (Mensch)
Oxytetracyclin	60 (Mensch)	3 (Huhn) bis 11 (Pferd) 8-10 (Mensch)	< 30	30 (Mensch)
Doxycyclin	70 (Hund) 45 (Katze) > 90 (Mensch)	10 (Hund) 8 (Katze) 12-18 (Mensch)	80-90 (Mensch)	25 (Mensch)

2.1.4 Anwendung in Veterinär- und Humanmedizin

Schon im Jahr 1948 wurde die wachstumsfördernde Wirkung der Tetracycline bei Schweinen und Masthühnern erkannt und ausgenutzt. Im Jahre 1954 kam dann die Verwendung als Sprüh- und Dippmittel zur Konservierung von Lebensmitteln hinzu (AYRES et al. 1956; TARR et al. 1952). Um 1970 setzte ein Umdenkprozeß ein, der 1978 zu einem europaweiten Verbot der Anwendung von Tetracyclinen als Futterzusatzstoff führte. Grundlage hierfür waren unter anderem zwei umfangreiche Studien, in denen auf die Gefahr der Resistenzentwicklung bei Keimpopulationen im Darm, durch die unbeschränkte Verwendung

von Tetracyclinen, hingewiesen wurde (SWANN 1969; FDA 1972). Nach diesem Verbot kam es vermehrt zu einem Einsatz der Tetracycline als Fütterungsarzneimittel auf tierärztliche Verschreibung, so dass es tatsächlich zu keiner Verringerung des Einsatzes dieser Antibiotikagruppe bei Nutztieren kam (BRAUDE 1978). In der Veterinärmedizin werden bei lebensmittelliefernden Tieren Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin eingesetzt. In der Humanmedizin wird vor allem Doxycyclin, aber auch Minocyclin und Tetracyclin eingesetzt, wobei das Minocyclin nur zur Anwendung beim Menschen zugelassen ist. Chlortetracyclin wird beim Menschen nur zur topischen Anwendung angeboten.

In Europa betrug der Gesamtverbrauch der Antibiotika 1997 ca. 10.500 Tonnen. Davon wurden 48 % in der Veterinärmedizin eingesetzt. Hiervon waren die Tetracycline mit 67 % die dominierende Stoffklasse (FEDESA 1998). Im Jahre 1999 betrug der Antibiotikaeinsatz 13.216 Tonnen. Angaben zum Tetracyclinanteil liegen allerdings nicht vor (FEDESA 2001).

2.1.5 Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte

4-Epi-Tetracyclin

Eine reversible Konfigurationsänderung an einer organischen Verbindung wird als Epimerisierung bezeichnet, wenn sie nur an einem von mehreren asymmetrischen C-Atomen stattfindet. In schwach sauren Lösungen (pH 2,0 – 6,0) kommt es bei allen Tetracyclinen zu einer Drehung der Dimethylammoniumgruppe am Kohlenstoffatom C₄. Die neuen Strukturen werden als 4-Epimere der Muttersubstanzen bezeichnet (MITSCHER 1978; ROGALSKI 1985).

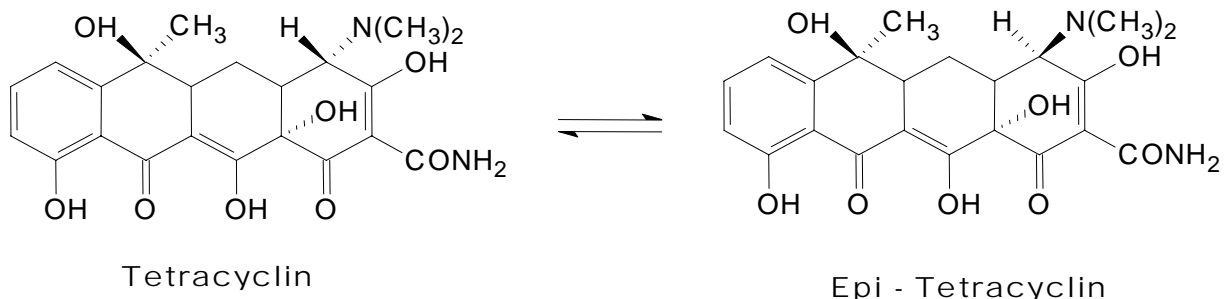
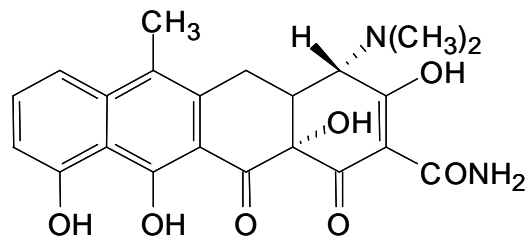


Abb. 2: Strukturformeln von Tetracyclin und 4-Epimer

Durch diese Konfigurationsänderung zeigt 4-Epi-Tetracyclin (e-TC) nur noch 4 % der antibiotischen Wirkung der Muttersubstanz (ROGALSKI 1985). Das Tetracyclin und seine Epimere bilden ein Gleichgewicht, welches abhängig vom jeweiligen Umgebungsmilieu ist. PH-Wert Verschiebungen und andere Milieuveränderungen beeinflussen dieses Gleichgewicht (SCHEDL 2000). Mehrere Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass es bereits in vivo zu einer Epimerisierung der Tetracycline kommen kann (KÜHNE 1995; ZURHELLE et al. 1999). Durch KÜHNE und WENZEL (2001) konnte in Kalbfleischproben das bereits in vivo gebildete Epimer 4-Epi-Chlortetracyclin nachgewiesen werden. Die Letale Dosis 50 von ETC liegt nach einer Untersuchung von KLIMOVA und ERMOLOVA (1976) 4,8 mal niedriger als die von TC (eine Letale Dosis 50 liegt vor, wenn 50 % der Versuchseinheiten zugrunde gegangen sind).

Anhydrotetracyclin

Bei stark saurem pH-Wert und bei Einwirkung hoher Temperaturen kann es zur Dehydratation von TC kommen. Unter Abspaltung von Wasser wird ein Wasserstoffatom vom C_{5A}-Atom an das C₆-Atom abgegeben. Eine Umkehrung der Reaktion ist möglich, tritt aber nicht spontan auf (MITSCHER 1978). Zur Bildung von Anhydrotetracyclin (ATC) kommt es vor allem durch zu lange oder fehlerhafte Lagerung (WALTON et al. 1970). ATC liegt im Gleichgewicht mit seinen Epimeren vor. Die antimikrobielle Wirksamkeit beträgt etwa ein Drittel der von TC (ROGALSKI 1985). Therapeutisch wird ATC nicht eingesetzt, da es schwere Nebenwirkungen hervorrufen kann, die vermutlich durch die nicht selektive Wirkung auf Zellmembranen zustande kommen (MITSCHER 1978; SCHNAPPINGER u. HILLEN 1996). Die Toxizität von ATC liegt 4,8 bis 100 fach höher als die von TC (KLIMOVA u. ERMOLOVA 1976). Außerdem soll ATC renale Dysfunktion und eine verstärkte Resistenzbildung hervorrufen (WALTON et al. 1970; BERTRAND et al. 1984).



Anhydrotetracyclin

Abb. 3: Strukturformel von ATC

KÜHNE et al. (2001) stellten in einem Hoherhitzungsversuch mit tetracyclinhaltigen Fleischknochenmehlen fest, dass es bei einer Temperatur von 133 °C zu einer partiellen Umwandlung von Tetracyclin in Anhydrotetracyclin und Epi-Anhydrotetracyclin (e-ATC) kommt. Die Gesamt-ATC-Konzentrationen nahmen um durchschnittlich 533 % zu.

Bei den Anhydrotetracyclinen handelt es sich nicht um typische Tetracycline, da sie im Gegensatz zu diesen eine bakterizide und keine bakteriostatische Wirkung aufweisen. OLIVA et al. (1992) stellten eine direkte Wirkung von ATC und e-ATC auf die Cytoplasmamembran von *E. coli* fest, die zu einer Lyse der Bakterienzelle durch Freisetzung von cytoplasmatischen Enzymen führte. Eine bakteriostatische Wirkung durch die Inhibition der Proteinbiosynthese in Bakterien konnte nicht nachgewiesen werden. Trotz des veränderten Wirkungsmechanismus funktionieren die Anhydrotetracycline als stärkere Induktoren der Tetracyclin-Resistenzgenexpression in Bakterien als die klassischen Tetracycline (BERTRAND et al. 1984). Dieses Phänomen wird durch die 33-fach stärkere Bindung von ATC im Gegensatz zu TC an den Tet-Repressor erklärt (DEGENKOLB et al. 1991).

2.1.6 Mechanismen der Resistenzentwicklung und Resistenzsituation

Aufgrund des sehr verbreiteten therapeutischen Einsatzes der Tetracycline in der Human- und Veterinärmedizin sind inzwischen Resistenzen bei zahlreichen Bakterienstämmen entstanden, wobei häufig Kreuzresistenzen gegen mehrere Mitglieder der Tetracyclinfamilie vorliegen. Besonders ausgeprägt sind diese Resistenzen bei Streptokokken, Salmonellen, *E. coli* und Pasteurellen (KROKER et al. 2002).

Die Vermittlung der Resistenzen und die dadurch bedingte Entstehung von Kreuz- und Mehrfachresistenzen erfolgt durch Plasmide. Dabei handelt es sich um extrachromosomale DNA-Moleküle, die nur wenige Gene enthalten. Durch Konjugation oder Transduktion können für die Resistenz verantwortliche Strukturgene von Bakterium zu Bakterium übertragen werden (GRÄFE 1992).

Es sind mehrere bakterielle Resistenzstrategien gegenüber Tetracyclinen bekannt:

1. Reduktion der intrazellulären Tetracyclinkonzentration

Durch Veränderungen in der Struktur der Cytoplasmamembran der Bakterien kommt es zu einer verlangsamten Aufnahme der Tetracyclinmoleküle in die Zelle (SCHNAPPINGER u. HILLEN 1996). Wichtiger ist jedoch ein aktiver Transport der Tetracycline aus der Zelle heraus (CHOPRA u. ROBERTS 2001).

2. Schutz der Ribosomen

BURDETT (1986) entdeckte bei Streptokokken ein Protein, das Ribosomen vor der Hemmwirkung von Tetracyclinen schützt. Dadurch kann die Proteinbiosynthese des Bakteriums ungehindert fortgesetzt werden.

3. Inaktivierung der Tetracycline durch modifizierende Enzyme

Bei Bacteroidesspezies wurde von GUINEY et al. (1984) ein Resistenzprotein entdeckt, das in der Lage ist, Tetracycline chemisch zu inaktivieren.

Seit 1992 werden vom BgVV (seit 01/2002 BVL) Resistenzen als Risiko bei der Arzneimittelanwendung erfasst. Die veterinärmedizinischen Untersuchungseinrichtungen sind an der Erfassung beteiligt indem sie Bakterienstämme aus diagnostischem Material auf Resistenzen überprüfen. In einer 1999 veröffentlichten bundesweiten Studie zeigten 92 % der *E. coli*-Isolate vom Schwein eine Resistenz gegenüber Tetracyclinen. Beim Rind waren dies 64 % und beim Geflügel 59 % (TROLLDENIER 1999). Die Situation bei den Resistenzen gegenüber *Pasteurella* zeigt, dass hier beim Schwein nur 24 % der Isolate eine Resistenz aufweisen.

2.2 Rückstände von Tetracyclinen in Lebensmitteln

Die Definition für Rückstände in Lebensmitteln findet sich in der Richtlinie 81/852/EWG: „Rückstände sind alle wirksamen Bestandteile oder deren Metabolite, die im Fleisch oder anderen Lebensmitteln enthalten sind, die von Tieren gewonnen wurden, denen das betreffende Arzneimittel verabreicht wurde.“ Demzufolge kann es nach der Anwendung pharmakologischer Wirkstoffe beim Tier in Abhängigkeit von ihrer Pharmakokinetik und der individuellen Wartezeit zwischen Anwendung und Fleischgewinnung zu Rückständen im Schlachttierkörper kommen.

2.2.1 Risikoabschätzung

Zur Einschätzung der Unbedenklichkeit eines Tierarzneimittels für den Menschen sind vielfältige Untersuchungen erforderlich.

Ein Arzneimittel wird zur Anwendung bei Tieren, die zur Lebensmittelgewinnung dienen, nur zugelassen, wenn

1. für den enthaltenen Wirkstoff ein MRL-Wert (maximum residue limit) gemäß der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 festgelegt ist und
2. das fertige Arzneimittel nach dem Arzneimittelrecht zugelassen ist.

Der MRL-Wert gibt die zugelassene Höchstmenge in verschiedenen Lebensmitteln tierischer Herkunft an und wird in der oben genannten Verordnung getrennt nach Tierarten und Geweben aufgelistet.

Die pharmazeutischen Unternehmen müssen jedes neue Arzneimittel umfangreichen Unbedenklichkeitsversuchen unterziehen und diese Ergebnisse der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) bzw. dem Ausschuss für Tierarzneimittel (CVMP – Committee for Veterinary Medicinal Products) vorlegen.

Bei diesen durchzuführenden Versuchen wird an Versuchstiere oral das zu untersuchende

Arzneimittel verabreicht und dessen Toxizität, Reproduktionstoxizität, Mutagenität, Kanzerogenität und Immunotoxizität bewertet. Bei der Zulassung eines Antibiotikums muss außerdem durch Versuche die Wirkung auf die menschliche Darmflora geprüft werden (BETTE 1996). Nachteilige Effekte sind hier das vermehrte Auftreten von Resistenzen bei der menschlichen Darmflora, Störungen des Stoffwechsels sowie eine Schwächung der Abwehr gegen pathogene Keime durch eine Änderung der Zusammensetzung der physiologischen Darmflora.

Diejenige Dosis, die keine substanzspezifische Wirkung bei der empfindlichsten Tierart mehr hervorruft, wird als NOEL („no observed effect level“) bezeichnet. Der NOEL dient zur Bestimmung der für den durchschnittlichen Verbraucher mit 60 kg Körpergewicht annehmbaren Tagesdosis („acceptable daily intake ADI“), das heißt der Rückstandsmenge, die der Verbraucher ohne erkennbares gesundheitliches Risiko ein Leben lang täglich aufnehmen könnte. Bei der Berechnung des ADI-Wertes kommt noch ein Sicherheitsfaktor von 10-1000 hinzu, der die Spezies, an der die Versuche durchgeführt wurden, sowie das toxikologische Profil der Substanz berücksichtigt. Dieser Sicherheitsfaktor ist ein Ersatz für die hypothetische lebenslange Exposition des Menschen gegenüber dem zeitlich begrenzten Tierversuch (BETTE 1996).

Zur Bestimmung von nachteiligen Effekten von antimikrobiellen Substanzen auf die humane Darmflora wird in mikrobiologischen Studien die MHK_{50} herangezogen. Die MHK_{50} (MHK = minimale Hemmkonzentration) ist die minimale Konzentration eines Arzneimittels, die das Wachstum von 50 % der Kulturen eines bestimmten Keimes hemmt (WHO 1998). Hierbei werden sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Untersuchungen durchgeführt, wobei die In-vitro-Untersuchungen nur unzureichend das ökologische System des Darmes nachahmen, aber besser getestet und validiert sind. In-Vivo-Untersuchungen können vor allem an sogenannten HFA-Ratten (HFA = human flora-associated) durchgeführt werden, die eine künstlich herbeigeführte humane Darmflora aufweisen.

Die gemeinsame Expertenkommission der Welternährungsorganisation (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, bedient sich bei der Ermittlung eines mikrobiologischen ADI folgender Formel:

$$\text{ADI } [\mu\text{g}/\text{kg KG}] = \frac{\text{MHK}_{50} [\mu\text{g}/\text{g}] \times \text{Masse des Colon-Inhaltes [g]}}{\text{bioverfügbare Fraktion} \times \text{Sicherheitsfaktor} \times \text{Körpergewicht [kg]}} \\ \text{der oralen Dosis}$$

wobei:

MHK₅₀ = mittlere MHK₅₀ der Stämme des getesteten Keims (obwohl MHK-Werte üblicherweise in $\mu\text{g}/\text{ml}$ ausgedrückt werden, erfolgt die Angabe hier in $\mu\text{g}/\text{g}$, damit der ADI in $\mu\text{g}/\text{kg}$ ausgedrückt werden kann; bei der Umwandlung in diese Einheit wird angenommen, dass die Dichte des Mediums 1 g/ml beträgt)

Masse des Colon-Inhaltes = es wird ein durchschnittlicher Wert von 220 g angenommen

Bioverfügbare Fraktion der oralen Dosis = die Fraktion der oralen Dosis, die das Colon erreicht und die dortige Mikroflora beeinflusst

Sicherheitsfaktor = liegt je nach Substanz zwischen 1 und 10

Körpergewicht = es werden als durchschnittliches Körpergewicht eines Erwachsenen 60 kg angenommen (analog zum toxikologisch hergeleiteten ADI)

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA) (1998)

Die toxikologisch oder mikrobiologisch bestimmten ADI-Werte bilden wiederum die Grundlage für die oben erwähnten MRL-Werte.

Für die Berechnung muss die relative Verteilung der Gesamtrückstände auf die essbaren Gewebe und die täglich davon verzehrte Menge berücksichtigt werden. Die EU definiert die täglichen Verzehrsmengen für Lebensmittel im sogenannten statistischen Warenkorb: 300 g Muskulatur, 100 g Leber, 50 g Niere, 50 g Fett, 1,5 l Milch, 100 g Ei und 20 g Honig. Mit

diesen hohen Verzehrsmengen sollen auch extreme Essgewohnheiten abgedeckt werden. Aus diesen genannten Faktoren wird schließlich die erlaubte Höchstmenge in $\mu\text{g}/\text{kg}$ für das jeweilige Gewebe festgelegt (BETTE 1996).

Die Festlegung dieser Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln wird einheitlich für die gesamte EU von der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) in London organisiert. Dabei beurteilen verschiedene internationale Fachkommissionen die ihnen von der pharmazeutischen Industrie zur Verfügung gestellten Gutachten.

2.2.2 Bisherige Untersuchungen über Resistenzinduktionen durch Rückstände von Tetracyclinen in Tierkörpern

Im Jahre 1990 wurde durch die JECFA eine Risikoabschätzung für OTC vorgenommen, die die Grundlage für die ersten europaweit gültigen MRLs für Tetracycline bildete (WHO 1990). In Studien an freiwilligen Versuchspersonen und Versuchshunden wurde als wesentliche Wirkung von OTC die Induktion von Resistenzen bei Enterobacteriaceae beobachtet. Dabei wurde ein NOEL von 2 mg/Person/Tag festgestellt. Aufgrund dieses Wertes wurde von der JECFA unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 10 ein ADI von 0-3 μg OTC/kg KGW empfohlen.

Im 45. JECFA-Report (1996) findet sich eine Risikoabschätzung für TC und CTC. Hier wurden die antimikrobiellen Wirkungen von TC und CTC auf humanpathogene Mikroorganismen sowie auf eine begrenzte Zahl von Bakterien der normalen humanen Darmflora untersucht (WHO 1996). Die JECFA stufte die antimikrobielle Potenz der verschiedenen Tetracycline als vergleichbar ein und legte den 1990 bestimmten ADI-Wert für OTC als Gruppen-ADI für alle Tetracycline fest. Die Übernahme der MRL-Werte für TC und CTC wurde ebenfalls empfohlen. Im gleichen Jahr wurde auch Doxycyclin hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf die humane Darmflora überprüft und ebenfalls ein ADI-Wert von 0-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW bestimmt (CVMP 1996).

Eine neuere Untersuchung der WHO von 1999 zeigte, dass der Sicherheitsfaktor von 10 zu streichen und statt dessen ein Gruppen-ADI-Wert von 0-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW festzusetzen ist. Hierbei wurden einer kontinuierlichen *E. coli*-Kultur, einem ADI-Wert von 25, 250 und 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW entsprechend, äquivalente Konzentrationen von TC zugesetzt. Nur die höchste

Konzentration führte zur Resistenzausbildung bei den untersuchten Keimen. Noch ist dieser Empfehlung der WHO keine rechtliche Umsetzung gefolgt.

2.2.3 Rechtliche Normen

In den Neunziger Jahren des vorigen Jahrhunderts erarbeitete die JECFA mehrere wissenschaftliche Berichte zur Bewertung der Tetracycline (WHO 1990, 1996, 1999). Die gültigen MRLs für Tetracycline sind in Anhang 1 der Verordnung EWG 2377/90 aufgelistet und basieren auf dem aktuellen ADI-Wert von 0-3 µg/kg KGW (Tab. 2)

Tab. 2: Höchstmengen für Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln (µg/kg bzw. µg/L) in der Europäischen Union (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY, 1992)

Pharmakologisch wirksamer Stoff	Marker-Rückstand	Tierart	MRL (µg/kg)	Zielgewebe
Chlortetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	100	Muskel
Oxytetracyclin			300	Leber
			600	Nieren
Tetracyclin			100	Milch
			200	Eier
Doxycyclin	Doxycyclin	Rinder: Nicht anwenden bei Tieren, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird	100	Muskel
			300	Leber
			600	Nieren
		Schweine	100	Muskel
		Geflügel: Nicht anwenden bei Tieren, von denen Eier für den menschlichen Verzehr gewonnen werden	300	Haut + Fett
			300	Leber
			600	Nieren

Aufgrund neuer toxikologischer Studien schlägt die WHO vor, die MRLs für die Tetracycline zu verdoppeln (WHO 1999). In den USA gelten bereits MRLs, die etwa um das 20fache höher liegen (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 1996) (Tab.3).

Tab. 3: Höchstmengen für Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{L}$) in den Vereinigten Staaten von Amerika (FDA, 1996)

	Muskulatur	Leber	Niere
Alle Tetracycline	2000	6000	12000

Die rechtliche Grundlage für die Untersuchung auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln bilden in Deutschland das Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB) sowie das Arzneimittelrecht. Die Überwachung von Lebensmitteln tierischer Herkunft auf Rückstände von gesundheitlich unerwünschten Stoffen geschieht aufgrund des Nationalen Rückstandskontrollplanes, der in der gesamten EU nach einheitlichen Maßstäben durchgeführt wird. Das BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) und die zuständigen Behörden der Bundesländer erstellen diesen Nationalen Rückstandskontrollplan jährlich neu. In ihm werden für jedes Bundesland konkrete Vorgaben über die Anzahl der zu untersuchenden Tiere und tierischen Erzeugnisse, die zu untersuchenden Stoffe, die anzuwendende Methodik sowie die Probenahme gemacht. Während jährlich ein bestimmtes Spektrum an Stoffen vorgegeben wird, auf das die entnommenen Proben mindestens zu untersuchen sind (Pflichtstoffe), können die Bundesländer darüber hinaus bei einer definierten Anzahl von Tieren und Erzeugnissen die Stoffe nach aktuellen Erfordernissen und speziellen Gegebenheiten frei auswählen. Darüber hinaus werden bei betrieblichen Eigenkontrollen und Qualitätssicherungssystemen weitere Untersuchungen durchgeführt, die teilweise auch rechtlich vorgeschrieben sind. Durch die Festlegung von Wartezeiten und konsequente tierärztliche Fleischuntersuchung ist das Auftreten von Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft in Deutschland in den letzten Jahren rückläufig (BVL 2003). Bei den untersuchten Schlachtierkörpern wiesen nur 0,2-0,3 % Tetracyclin-Rückstände oberhalb der festgesetzten Höchstmengen auf.

Bei diesen Betrachtungen wird die Gefahr durch eine Kontamination der Umwelt durch Tetracycline sowie der Resistenzinduktion bei Keimen im Darm des Schlachttieres und des Endverbrauchers außer Acht gelassen (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY 1999).

2.2.4 Einlagerung in Knochen

Die so genannten gebundenen Rückstände nehmen eine Sonderstellung bei der Rückstandsanalytik ein. Diese Rückstände sind Verbindungen, die kovalent an Makromoleküle im Körper gebunden sind und nicht durch wässrige oder organische Lösungsmittel extrahiert werden können (SMIT, HAAGSMA u. RUITER 1999).

MILCH et al. veröffentlichten 1957 als erste eine Untersuchung auf das Phänomen der Einlagerung von Tetracyclinen in Knochengewebe. Drei Jahre später stellten BUYSKE et al. (1960) gebundene Rückstände von TC und CTC in Knochen von Tieren, die mit Tetracyclinen behandelt wurden, fest. Die Tetracycline weisen aufgrund ihrer Struktur eine hohe Affinität zu metallischen Kationen (u.a. Eisen, Magnesium, Calcium) und mit verschiedenen Anionen (Phosphat, Citrat) auf und bilden so mit Calcium stabile Chelatkomplexe (ADAM u. CHRIST 1993). Aufgrund des häufigen Einsatzes von Tetracyclinen bei lebensmittelliefernden Tieren können bei Schlachttieren bis zu 50,0 mg/kg Tetracyclin im Knochen nachgewiesen werden.

Tab. 4: Qualitativer Tetracyclin-Nachweis in Knochen geschlachteter, tauglich beurteilter Tiere (nach KÜHNE et al., 2000) n: Anzahl untersuchter Tierkörper bzw. Herdensammelproben*

Tierart	(n)	Positiv
Schweine		
- Mastschweine	(17.150)	70 %
- Sauen	(3.275)	10,4 %
- Spanferkel	(345)	72,8 %
Puten*	(85)	100 %
Masthähnchen*	(152)	34,9 %
Enten	(86)	95,3 %
Kälber	(1.560)	18,8 %

Das gehäufte Auftreten von Tetracyclin-Rückständen in den Knochen tauglich beurteilter, geschlachteter Schweine wurde durch die Untersuchungen von KÜHNE et al. (2000) belegt: In norddeutschen Schlachthöfen wurden insgesamt 17.150 tauglich beurteilte Schlachtkörper von Mastschweinen auf Fluoreszenz der Knochen untersucht. Nur 30 % der Mastschweine konnten als negativ beurteilt werden (Tab. 4).

Der bevorzugte Einlagerungsort sind die Mineralisierungszonen von knochenbildenden Geweben. Tetracyclin tritt dort in Form von Tetracyclin-Calcium-Orthophosphat-Chelaten auf (BUYSKE et al. 1960; STAHLMANN u. LOHDE 2001), wobei die Affinität der Chelatbindung in der Reihenfolge OTC<TC<CTC zunimmt (OTTEN et al. 1975).

Die Menge des eingelagerten Tetracyclins hängt von der verabreichten Tetracyclindosis sowie vom Zeitpunkt der Applikation im Hinblick auf das Knochenwachstum ab. Demzufolge lagern junge Tiere, die sich in der Knochenwachstumsphase befinden, größere Tetracyclinmengen bei gleicher Dosis als Chelate in ihre Knochen ein als adulte Tiere (BRÜGGEMANN et al. 1966). Wird die Behandlung mit Tetracyclinen beendet, sinkt der Gehalt der gebundenen Rückstände im Knochen zunächst deutlich, um dann über Wochen und Monate in noch nachweisbaren Konzentrationen relativ konstant zu bleiben (BUYSKE et al. 1960).

Knochen mit gebundenen Tetracyclin-Rückstände zeigen eine Fluoreszenz unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm (BLOMQUIST u. HANNGREN 1966), wobei diese Fluoreszenz durch das Naphtacen-Gerüst der Tetracycline verursacht wird (DÄMMRICH 1969). Bei einer Untersuchung von Knochen von geschlachteten Schweinen, Kälbern und Rindern auf Rückstände von Tetracyclinen entdeckten GEMMER et al. (1973) mittels UV-Licht häufig eine Fluoreszenz. KÜHNE und EBRECHT kombinierten 1993 erstmals die rein qualitative Untersuchung mittels Fluoreszenz-Nachweis unter UV-Licht mit der sowohl qualitativ als auch quantitativ aussagekräftigen Untersuchungsmethode der HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Dabei fiel auf, dass in den meisten Fällen eine positive Knochenfluoreszenz mit dem gleichzeitigen Nachweis von Tetracyclin-Rückständen in den essbaren Geweben des Schlachttierkörpers korrelierte. Daraus konnte der Schluß gezogen werden, dass die Untersuchung der Knochen von geschlachteten Tieren mittels UV-Licht als ein schnelles und problemloses Screeningverfahren im Rahmen der Rückstandskontrolle angesehen werden kann (KÜHNE u. EBRECHT 1993).

2.2.5 Risikoabschätzung gebundener Tetracyclin-Rückstände in Knochen

Im Jahr 1969 wurde erstmalig eine Risikoabschätzung für Tetracyclin-Rückstände in Knochen geschlachteter Tiere veröffentlicht. Im wissenschaftlichen Schrifttum wurde angenommen, dass gebundene Tetracycline antimikrobiell inaktiv sind und Knochen für die menschliche Ernährung nicht verwendet werden und somit kein Risiko für den Verbraucher darstellen (WHO 1969; STAHLMANN u. LODE 2001).

Die Knochen von Schlachttieren werden Risiko-Gruppen zugeordnet und dementsprechend behandelt (Tab. 5).

Tab. 5: Verwertungsmöglichkeiten für Schlachtnebenprodukte nach Kategorien in der EU (Commission of the European Community, 2002; Council of the European Community, 1964)

	Eigenschaften des Rohmaterials	Verwertungsmöglichkeiten
Kategorie I	- Risikomaterial (z. B. Schädel und Wirbelsäule Rind), Heim-, Zoo- und Labortiere - Nachweis verbotener Oder gesundheitsschädlicher Substanzen	Vernichtung (Verbrennung / Deponie)
Kategorie II	- gefallene Tiere, Magen-Darm-Inhalt - Nachweis zugelassener Substanzen in Konzentrationen oberhalb gemeinschaftsrechtlich festgesetzter Höchstmengen	Non-food-Industrie (Chemie, Düngemittel)
Kategorie III	- genusstaugliche Tierkörperteile Futtermittel und Düngemittel	Lebensmittel

Da für Tetracyclin-Rückstände in Knochen bisher keine Höchstmengen festgelegt wurden, gelten betroffene Knochen als genusstaugliche Tierkörperteile der Kategorie III.

Diese Knochen werden in unterschiedlicher Weise weiter verwertet (Tab. 6):

Tab. 6: Verwertung von Knochen geschlachteter, tauglich beurteilter Tiere in der Europäischen Union (Übersicht nach KÜHNE u. MITZSCHERLING 2004)

Verwertung	Umfang	Nutzung
Separatorenfleisch	- nur von Schwein u. Geflügel - 600.000 t/a (EU)	Herstellung von Fleischerzeugnissen
Fleischknochenmehl	156.895 t/a (D)	Thermisch (34 %) Düngemittel (66%) - Export?
Gelatine	115.000 t/a (EU)	Lebensmittel Futtermittel Pharmazeutische Industrie
Mineralfuttermittel	unbekannt	Verfütterung

Beim so genannten Separatorenfleisch handelt es sich um Restfleisch, dass durch einen mechanischen Vorgang vom Knochen gelöst wird (MRM = Mechanical Recovered Meat). Dieses Fleisch wird als Rohstoff zur Herstellung verschiedener Fleischerzeugnisse eingesetzt. In der EU ist seit dem Jahre 2000 nur noch der Einsatz von MRM von Geflügel und Schwein erlaubt. Der Grund hierfür ist die Kontaminationsgefahr mit dem BSE-Prion (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY 2000). Allein beim Schwein werden in der EU jährlich 250.000 Tonnen MRM hergestellt. Der Knochenanteil beim Separatorenfleisch liegt bei 2,5 - 5 % (ANHALT 1980; VARNAM u. SUTHERLAND 1995). Die mögliche Gesamtbelastung durch Tetracyclin-Rückstände liegt also bei 1250-2500 µg/kg. Nach der Restfleischgewinnung werden die Knochen in spezialisierten Betrieben zu Fleischknochenmehl verarbeitet. In der EU darf dieses Erzeugnis allerdings nicht an lebensmittelliefernde Tiere verfüttert werden (COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITY 2000). Das Fleischknochenmehl kann zur thermischen Nutzung verbrannt

oder als Dünger verwendet werden. Weiterhin wird aus Knochen Gelatine hergestellt, wozu auch die Speisegelatine gehört.

Bis jetzt wurde angenommen, dass Tetracyclin-Rückstände aus Knochen antimikrobiell inaktiv und bei einer thermischen Behandlung in unbedeutende Bruchstücke zerfallen.

In einem In-vitro-Verdauungsversuch untersuchten KÜHNE und KÖRNER (2001) die Bioverfügbarkeit von gebundenen Chlortetracyclin-Rückständen. Von den gefundenen Rückständen waren 51,6 % antimikrobiell aktiv. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass oral aufgenommene, gebundene Tetracyclin-Rückstände durch Verdauungsvorgänge zumindest teilweise ihre antimikrobielle Aktivität wiedererlangen können.

WEIDENBERG (2002) konnte bei der Gelatineherstellung aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln sowohl bei der Herstellung unter sauren Aufschlussbedingungen als auch in handwerklich hergestellter Gelatine Tetracyclin-Rückstände nachweisen. Die Säurelösungen aus der Gelatineherstellung, die hohe Tetracyclinkonzentrationen aufweisen können, dienen der Herstellung von Dicalciumphosphat, welches u. a. als Dünger und als Ergänzungsfuttermittel für lebensmittelliefernde Tiere verwendet wird (KÜHNE u. MITZSCHERLING 2004).

SCHULZE (2003) stellte fest, dass aufgrund der Rückstandsproblematik in Knochen gebundener Tetracycline für die Herstellung von Gelatine nach dem sauren Aufschlußverfahren bezüglich der Mazerationsdauer als auch der Konzentration der verwendeten Salzsäure gesetzliche Normen festgelegt werden sollten. Erwähnt wird auch die mögliche Umweltbelastung durch die Einbringung von Tetracyclinen aus der Gelatineherstellung über Abwässer und Nebenprodukte in die Umwelt.

2.2.6 Hitzestabilität gebundener Tetracyclin-Rückstände in Knochen

In Untersuchungen von KÜHNE et al. (2001) an tetracyclinhaltigen Fleischknöchelmehlen, die auf 133 °C hoherhitzt wurden, erwiesen sich die gebundenen Tetracyclin-Rückstände als äußerst hitzeresistent. Es kam zu einer Zunahme der Konzentration der Anhydroformen (Anhydrotetracyclin und sein Epimer als Dehydratationsprodukt von Tetracyclin) um mehr als 500 %. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Erhitzung auf 133 °C nicht allein zu einer Reduktion von Tetracyclin führt, sondern zu einem quantitativen Umbau zu

Anhydrotetracyclin. Anhydrotetracycline gelten als stärker toxisch als ihre Muttersubstanz (KLIMOVA u. ERMOLOVA 1976). Nähere Untersuchungen hierzu fehlen jedoch. Bekannt ist aber, dass Anhydrotetracycline deutlich stärkere Induktoren für Resistenzen sind als Tetracycline (MOYED et. al. 1983) und ein anderes antimikrobielles Wirkungsspektrum aufweisen (HALLING-SÖRENSEN et al. 2002).

KÖRNER (2000) untersuchte die Auswirkungen von Hitze auf gebundene Tetracyclin-Rückstände anhand von CTC- und TC-haltigen Fleischknochenmehlen, die auf 100 °C und 133 °C erhitzt wurden. Die Hoherhitzung auf 133 °C über einen Zeitraum von 45 min führte im Mittel zu einer Reduktion der in den Fleischknochenmehlen nachgewiesenen CTC-Konzentration auf 11 % des Ursprungsgehaltes, während TC um ca. 50 % reduziert wurde. Im Vergleich dazu hatte die Hitzeeinwirkung von 100 °C keine Abnahme der nachweisbaren Konzentrationen von CTC und TC zur Folge.

In diesem Zusammenhang sollten auch die nachfolgend aufgeführten Herstellungsbedingungen für Tiermehl und Fleischknochenmehl und die daraus möglicherweise resultierenden Gefahren berücksichtigt werden (Tab. 7).

Tab. 7: Herstellungsbedingungen für Tiermehl und Fleischknochenmehl in der EU (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY 2002) zur Verwendung als Futtermittel

Methode	Temperatur	Zeit	Partikelgröße
1	133°C	20 min	50 mm
2	100°C 110°C 120°C	125 min. 50 min. 50 min.	150 mm
3	100°C 110°C 120°C	95 min. 55 min. 13 min.	30 mm
4.-7.	Andere Temperatur Kombinationen	Zeit	

Gebundene Tetracyclin-Rückstände in Fleischerzeugnissen sind dagegen weitaus hitzeempfindlicher: In HPLC- Studien an Brühwürsten aus mit OTC und CTC dotiertem Fleisch beobachtete KLEBINGER (1992) im Temperaturbereich von 68 °C - 72 °C einen OTC- und CTC-Abbau von 20 % innerhalb von 50 min. Eine stärkere Abnahme der Wirkstoffkonzentration durch den Brühprozess zeigte sich bei Temperaturen von über 75 °C nach 30 min. Hier trat bei OTC ein Wirkstoffverlust von 40 % ein, während die Konzentration von CTC um 60 % reduziert wurde. ROSE et al. (1996) untersuchten mittels der HPLC die Stabilität von OTC in Wasser und in Pflanzenöl und stellten in Wasser bei 100 °C, 80 °C und 62 °C Halbwertszeiten von 2, 15 und 120 min fest. In Öl wurde die OTC-Konzentration bei 110 °C nach 150 min um 25 % verringert; bei 180 °C betrug die Halbwertszeit 8 min.

Unter Verwendung von mikrobiologischen Methoden untersuchten EGMOND et al. (2000) das Hitzeresistenzverhalten von Oxytetracyclin, indem sie ein Homogenisat aus Schweinefleisch, -niere und -leber mit OTC dotierten und verschiedenen Hitzebehandlungen unterzogen: Nach einer Erhitzung im Wasserbad bei 80 °C für 15 min wurde ein Aktivitätsverlust von 20 % festgestellt, und die anschließende Hoherhitzung auf 134 °C bei 3 bar über den Zeitraum von 20 min führte zu dem vollständigen Aktivitätsverlust von OTC.

2.2.7 Nachweisverfahren für Tetracycline

Für den Nachweis von Tetracyclin-Rückständen in biologischen Materialien können zunächst mikrobiologische und enzymimmunologische Methoden (Hemmstofftest, Brillantschwarzreduktionstest, ELISA) angewendet werden, die jedoch keine qualitative und quantitative Aussage erlauben.

Die von der EU zur Rückstandsüberwachung von Tetracyclinen vorgegebenen mikrobiologischen Verfahren (HEITZMANN 1994) sind nur bedingt geeignet, da auch rechtlich zugelassene Konzentrationen dieser Antibiotika in Lebensmitteln deutlich positive Hemmstofftest-Ergebnisse bewirken können (KÜHNE u. EBRECHT 1993).

Als Screeningmethode für die Untersuchung von Knochen ist der fluoreszenzoptische Nachweis von Tetracyclinen unter UV-Licht geeignet (KÜHNE u. EBRECHT 1993, KÜHNE et al. 2000). Die amtliche oder betriebliche Kontrolle der Einhaltung von MRLs setzt jedoch

die Verwendung von genau festgelegten Methoden voraus. Durch die Anwendung von chemisch-physikalischen Methoden können Tetracycline sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden. Hierzu zählen die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Absorptions-, UV-Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektion (OKA et al. 2000). Die Eigenschaft der Tetracycline, mit Kationen stabile Chelatkomplexe einzugehen, stellt das Hauptproblem bei der Extraktion, Aufarbeitung und HPLC-Elution dar. Erst mit dem Einsatz von Komplexbildnern wie Oxalsäure, EDTA usw. wurden niedrigere Nachweisgrenzen und eine reproduzierbare Analytik möglich (KAUFMANN et al. 1999, OKA et al. 2000).

Die vorläufige amtliche Methode zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln sieht die Extraktion mit Succinatpuffer vor. Für die Aufreinigung wird der Einsatz von Chelating-Sepharose-Säulen, die mit Kupfer beladen werden, in Kombination mit einer C-18 - Festphasenextraktion vorgeschrieben (ANONYM 2000).

Für den Nachweis von Tetracyclinen in Knochen ist eine Extraktion mit einer starken Säure erforderlich. KÜHNE et al. (2000) führten hierzu eine 10-stündige Extraktion mit 1 M HCL durch.

2.3 Zusammenfassende Bewertung des wissenschaftlichen Schrifttums

Bei der Bewertung der möglichen Gefahren durch Tetracyclin-Rückstände in Schlachttierkörpern kann bis zum jetzigen Zeitpunkt im Schrifttum als nicht hinreichend geklärt gelten, in welchem Maße an Knochen gebundene Tetracycline und ihre Umbauprodukte in den Organismus gelangen und welche Wirkung sie auf die Empfindlichkeit der normalen Darmflora gegenüber Tetracyclinen haben können.

Aktuelle Bedeutung hat diese Fragestellung angesichts der möglichen Eintragungswege von Tetracyclinen über MRM und Tiermehle in die Nahrungskette.

Anhand eines Tiermodelles soll die sekundäre Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclin-Rückständen und Anhydrotetracyclinen beim Säugetier untersucht werden, um diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen und daraus resultierende eventuelle Gefahren abschätzen zu können.

3 Material und Methoden

Die vorliegende Studie gliedert sich in mehrere Abschnitte. Zuerst wurde aus Feldproben ein Pool tetracyclinhaltiger Knochenmehle hergestellt und mittels HPLC hinsichtlich der Rückstandsbelastung charakterisiert. Anschließend wurden im Tiermodell diese Knochenmehle sowie - in Parallelgruppen - Tetracyclin-Reinsubstanzen über 15 Tage oral verabreicht. Harn- und Kotproben wurden kontinuierlich genommen und mittels HPLC auf eventuelle Tetracyclin-Rückstände untersucht. Zudem wurde eine MHK-Wert-Bestimmung für Tetracyclin an - aus dem Kot der Versuchstiere - isolierten *E. coli*-Isolaten durchgeführt.

3.1 Herstellung von Knochenmehl aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln

Aus tetracyclinhaltigen Röhrenknöcheln von tauglich beurteilten, geschlachteten Mastschweinen wurden 1.000 g Knochenmehl hergestellt. Die verwendeten Knochen stammten aus einem lokalen Zerlegebetrieb. Die Auswahl erfolgte durch Screening mittels UV-Lampe (Merck GmbH, 1.10203) bei einer Wellenlänge von 366 nm. Bei dieser Wellenlänge kann eine deutliche Fluoreszenz des eingelagerten Tetracyclins festgestellt werden. Die Oberfläche des bereits zerkleinerten und entfetteten Knochenmaterials wurde in einem abgedunkelten Raum nochmals unter UV-Auflicht systematisch durchgemustert. Ausgewählt wurden nur deutlich fluoreszenzpositive Knochen splitter mit zahlreichen, an der Oberfläche sichtbaren fluoreszierenden Bereichen.

Die ausgewählten Knochen splitter mit einer Größe von 3 – 20 mm wurden zunächst mit der institutseigenen Knochenmühle in 2 – 6 mm große Partikel grob zerkleinert. Anschließend erfolgte der Mahlvorgang im Institut für Tierernährung der Tierärztlichen Hochschule. Für das Mahlen der Knochen wurde eine Probenmühle vom Typ IK A 10 der Fa. IKA Labortechnik verwendet. Die Korngröße des Knochenmehls betrug anschließend maximal 1 mm.

3.1.1 Aufarbeitung der Proben für die High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Zunächst wurden von dem gut durchmischten, homogenen Knochenmehl 8 Proben von jeweils 1g in einen Zentrifugenbecher eingewogen und mit 20 ml 1 M HCL (Carl Roth GmbH & Co KG, 4625.2) übergossen. Die Proben wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Proben 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge Z 383 K, Hermle Labortechnik GmbH). Die Überstände wurden über trockene Faltenfilter (11 cm Durchmesser, Macherey-Nagel GmbH & Co KG) in Erlenmeyerkolben filtriert.

4 der 8 Proben wurden erneut mit 20 ml 1 M HCL versetzt und nochmals im Kühlschrank bei +8 °C inkubiert. Die übrigen 4 Proben wurden bei den gleichen Bedingungen im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden zunächst die erneut mit HCL versetzten Proben 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert und der Überstand in Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurde der pH-Wert der 8 Proben mit 30 %iger NaOH und 1 N HCL auf pH 4,0 eingestellt.

Die so vorbereiteten Proben konnten nun zur weiteren Aufreinigung auf beladene Chelating-Sepharose-Säulen gegeben werden.

Herstellung der Chelating-Sepharose-Säulen:

Es wurden 8 Glassäulen (2 cm im Durchmesser) mit Glaswolle und mit jeweils 5 ml einer Chelating-Sepharose-Suspension (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, I-4510) befüllt. Nach Absetzen des festen Materials wurde die überschüssige Flüssigkeit abgelassen und die Säule mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe getrocknet.

20 ml Kupfersulfatlösung (5 g CuSO₄ (Merck Eurolab GmbH, 102791)/ l Aqua dest.) wurden über das Gel-Bett gegeben. Darauf wurde ein weiterer Glaswollepfropf geschoben. Anschließend wurden 15 ml Succinatpuffer pH 4 (5,9 g Bernsteinsäure (Carl Roth GmbH & Co KG, 8268.2)/ l Aqua dest.) über die Säule gegeben.

Nachdem die Proben über die Chelating-Sepharose-Säule gelaufen waren, wurden die Säulen mit 10 ml Aqua dest., mit 30 ml Methanol (Carl Roth GmbH & Co KG, 7342.1) und weitere zweimal mit 10 ml Aqua dest. gewaschen.

Die Elution der Tetracycline erfolgte mit 40 ml EDTA-Succinatpuffer (37,2 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Titrierkomplex III, (Carl Roth GmbH & Co KG, 8043.2)/ 1 Succinatpuffer pH 4). Dieser Vorgang wurde mit 10 ml dieser Lösung wiederholt.

Es schloss sich eine Reinigung der vereinigten Eluate über C18ec-Festphasensäulen (Chromabond Säulen c18ec, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, 730014) an. Diese Säulen wurden vorher zunächst mit 5ml Methanol und dann mit 5 ml Aqua dest. vorbereitet. Nach dem Durchlauf der Eluate wurden die Säulen mit 5 ml Aqua dest. gewaschen und anschließend 10 min mit einer Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt. Die Tetracycline wurden über Nacht mit 5 ml Methanol eluiert.

Das Einengen der Eluate am nächsten Tag erfolgte im Rotations-Vakuum-Konzentrator (Alpha RVC, Martin Christ GmbH) unter den vom Hersteller empfohlenen Betriebsbedingungen für methanolhaltige Proben.

Die eingedampften Fraktionen von etwa 0,4 ml wurden schließlich mit Eluent für die HPLC (Acetonitril (Carl Roth GmbH & Co KG, 7330.1) zu Oxalsäure (Merck Eurolab GmbH, 100495) im Verhältnis 1:4) auf 1,0 ml aufgefüllt.

Die so vorbereiteten Proben wurden bei - 18 °C bis zur Untersuchung tiefgefroren.

3.1.2 HPLC-Untersuchung

Die HPLC-Anlage bestand aus folgenden Geräten bzw. Materialien:

HPLC-Pumpe La Chrom L 7110, Merck Eurolab GmbH

Degasser	Knauer GmbH
Vorsäule	CC 8/4 Lichrospher 100-5 RP 18, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Trennsäule	CC 125/4 Lichrospher 100-5 RP 18, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
UV-Detektor	Photodiode Array UV/VIS-Detektor, Typ SPD-M6A, Shimadzu GmbH
Integrator	C-R5A Chromatopac, Shimadzu GmbH

Als Eluenten wurden verwendet:

a.) für den Nachweis der Tetracycline (Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin) und ihrer Epimere:

- 50 vol. % Acetonitril (Carl Roth GmbH & Co. KG, 7330.1)
- 50 vol. % 0,01 M Oxalsäure (Merck Eurolab GmbH, 100495)
- Fluss: 0,6 ml/min

b.) für den Nachweis der Anhydrotetracycline (Anhydrotetracyclin, Anhydrochlortetracyclin) und seiner Epimere:

- 35 vol. % Acetonitril
- 65 vol. % Phosphorsäure, 5 %-ig (Carl Roth GmbH & Co. KG, 9079)
- Fluss: 0,7 ml/min

Für die Erstellung der Eichkurven wurden Standardlösungen der folgenden Substanzen (je 1 mg in 1 ml Aqua dest.) hergestellt und bei -40 °C gelagert:

- Oxytetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, O-5875)
- Tetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-3383)
- Chlortetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-4881)
- 4-Epi-Tetracyclin Hydrochlorid (Arcos Organics, 23312-1000)
- 4-Epi-Chlortetracyclin Hydrochlorid (Arcos Organics, 26823-1000)
- Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (Janssen, 23.313.33)
- 4-Epi-Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (Arcos Organics, 23311-1000)

Mit dem jeweiligen Eluenten wurden die Arbeitsstandards für die HPLC verdünnt. Die Eichkurven wurden mit den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml erstellt.

Die Wiederfindungsraten zu den Extraktionsmethoden für Tetracycline aus Knochen wurden aus den vorhandenen laboreigenen Daten übernommen. Für die Ermittlung der Wiederfindungsraten der Extraktionsmethode für Tetracycline aus HCL wurde rückstandsfreie 1 M HCL (Carl Roth GmbH & Co. KG, 4625.2) mit den einzelnen Tetracyclinen dotiert und einer Aufarbeitung unterzogen. Oxytetracyclin sowie alle Formen des Tetracyclins wurden jeweils in einer Konzentration von 5 µg/ml dotiert. Chlortetracyclin und 4-Epi-Chlortetracyclin wurden wegen der geringeren Empfindlichkeit des UV-Detektors jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml dotiert. Die Messung am UV-Detektor erfolgte bei einer Wellenlänge von 360 nm für die Tetracycline und ihre Epimere bzw. einer Wellenlänge von 435 nm für die Anhydrotetracycline und ihre Epimere.

Die Kalkulation der Ergebnisse erfolgte über die Peakflächen unter Anwendung der externen Standard-Methode und unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Wiederfindungsraten mittels Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel (Version 2000). Die Umrechnung in µg/kg erfolgte unter Berücksichtigung der Einwaagen und des Injektionsvolumens.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte unter Beachtung der Richtlinien für die Qualitätssicherung im Rückstandslabor (HEITZMANN 1994).

3.2 Modell zur Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclin- und Anhydrotetracyclin-Rückständen aus dem mittels HPLC untersuchten Knochenmehl

3.2.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden insgesamt 40 weibliche Crl: NMRI-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von der Fa. Charles River, Sulzfeld geliefert. Das Gewicht der Mäuse betrug bei Versuchsbeginn ca. 20 g.

3.2.2 Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Crl: NMRI-Mäuse wurden zur Akklimatisierung für 14 Tage in institutseigenen Makrolonkäfigen gehalten. Die Gruppengröße betrug jeweils 5 Tiere. Die Fütterung erfolgte mit Standard-Diät Pellets für Mäuse der Fa. Altromin, Lage-Lippe (Bestell-Nr.: 1324) ad libitum. Wasser stand den Tieren ebenfalls ad libitum zur Verfügung.

Für den Versuch wurden die Tiere von Montag 8.00 Uhr bis Freitag 15.00 Uhr einzeln in institutseigenen Stoffwechsellkäfigen gehalten. In dieser Zeit erfolgte die Fütterung der Tiere versuchsgruppenspezifisch und zusätzlich mit Standard-Diät Pellets und Wasser ad libitum. Eine Versuchsreihe hatte jeweils 3 Zyklen von Montag bis Freitag. Für die Ermittlung der Leerwerte erfolgte die Aufstallung der Tiere für den 1. Versuchszyklus bereits Sonntagnachmittags vom diensthabenden Tierpfleger, so dass montags vor Versuchsbeginn die Proben zur Ermittlung der Leerwerte gewonnen werden konnten.

In der Zeit von Freitag 15.00 Uhr bis Montag 8.00 Uhr wurden die Tiere in den ursprünglichen 5er Gruppen in den institutseigenen Makrolonkäfigen gehalten und nur mit der Standard-Diät und Wasser ad libitum versorgt. Um Verwechslungen der Tiere auszuschließen erfolgte eine Kennzeichnung der Tiere, so dass jede Maus eindeutig zugeordnet werden konnte. Diese Kennzeichnung erfolgte auf den Schwänzen der Mäuse mit wasserfestem Farbstift. Sowohl die Makrolonkäfige als auch die Stoffwechsellkäfige befanden sich in einem klimatisierten Tierraum an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Der Raum

hatte eine Raumtemperatur von 22°C und die Hell- / Dunkelphase betrug jeweils 12 Stunden im Wechsel.

3.2.3 Einteilung der Versuchsgruppen und Gewinnung des Probenmaterials

Die Versuchstiere wurden in 4 Versuchsgruppen eingeteilt. In jeder Gruppe wurden 10 Tiere separat untersucht. Von jedem Tier wurde täglich 1-2-mal Kot und Urin gesammelt. Dazu wurden die Trichter der Stoffwechsellkäfige mit einem feinen Draht versehen, so dass der Kot auf dem Draht liegen blieb und der Urin abfließen konnte. Der Abfluss des Trichters wurde mit einem 2,5 ml Eppendorfhütchen versehen, in dem der Urin aufgefangen wurde. Der Kot wurde mit Hilfe eines Trichters in sterile, verschließbare Probengefäße eingefüllt. Die Proben für die HPLC-Untersuchung wurden bis zu ihrer Untersuchung bei -18° C gelagert.

Versuchsgruppe A:

Den 10 Tieren dieser Versuchsgruppe wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen täglich eine Versuchsdiät (1 g hemmstofffreies, frisch zerkleinertes Schweinehackfleisch + 1 g Knochenmehl, versehen mit 50µl Gewürzextrakt) angeboten. Zusätzlich wurden den Tieren Wasser und Standard-Diät Pellets für Mäuse ad libitum angeboten.

Die Versuchsdiät wurde jeden Tag für jedes Tier frisch hergestellt und abgewogen. Während der Fütterung mit dieser Mischung wurde in separaten Eppendorfhütchen der Urin aufgefangen, um eine Kontamination der Mischung durch das im Knochenmehl enthaltene Tetracyclin zu vermeiden. Der Gehalt der Tetracycline im Knochenmehl betrug circa 20µg/g. Die Verzehrsmenge wurde rechnerisch bestimmt und dokumentiert.

Versuchsgruppe B:

Die 10 Tiere in dieser Gruppe wurden ausschließlich mit Standard-Diät Pellets für Mäuse gefüttert.

Versuchsgruppe C:

In dieser Gruppe wurde jedem der 10 Tiere 1 x täglich eine Dosis von 20 µg Tetracyclin Hydrochlorid per os eingegeben. Die Substanz wurde zu diesem Zweck in Wasser für Injektionszwecke gelöst. Des Weiteren wurden den Tieren Wasser und Standard-Diät Pellets für Mäuse ad libitum angeboten.

Versuchsgruppe D:

Diese 10 Tiere erhielten 1 x täglich eine Dosis von 20 µg Anhydrotetracyclin-Hydrochlorid per os verabreicht. Die Substanz wurde zu diesem Zweck in Wasser für Injektionszwecke gelöst. Des Weiteren wurden den Tieren Wasser und Standard-Diät Pellets für Mäuse ad libitum angeboten.

3.2.4 Versuchsende

Am letzten Versuchstag wurden die Tiere nachmittags tierschutz- und fachgerecht getötet. Den Mäusen wurden folgende Organe entnommen: Leber, Nieren, Magen-Darm-Trakt. Die Organproben und der Tierkörper wurden in separaten Probengefäßen eingefroren und für weitere wissenschaftliche Studien bei - 18 °C gelagert.

3.3 MHK-Wert-Bestimmung für Tetracyclin bei *E. coli* aus Mäusekot

Für die MHK-Wert-Bestimmung bei den im Mäusekot vorhandenen *E.coli* Bakterien wurden die Kotproben der Tiere gesammelt. Die Kotproben, die zur Leerwertbestimmung der MHK-Werte dienen, wurden montags vor Versuchsbeginn gesammelt. Diese Proben wurden bis zum Untersuchungsbeginn am Donnerstag bei einer Raumtemperatur von 22 °C gelagert.

Die Kotproben für die mikrobiologische Untersuchung vom letzten Versuchstag wurden freitags gewonnen. Die Lagerung erfolgte bis zur Probenaufarbeitung am Montag bei einer Raumtemperatur von ebenfalls 22°C.

3.3.1 Etest®

Der Etest® ist ein Verfahren (AB BIODISK, Schweden) zur Bestimmung des MHK-Wertes (minimale Hemmstoff-Konzentration). Der Teststreifen besteht aus einem dünnen, undurchlässigen Testträger (5 x 50 mm). Die eine Seite des Streifens ist mit einer Skala von MHK-Werten kalibriert, die 15 Verdünnungen mit dem Faktor 0,5 einschließt. Auf der anderen Seite ist ein fortlaufender Tetracyclin-Gradient aufgebracht. Der Antibiotika-Gradient deckt von 0,16µg/ml bis 256 µg/ml einen weiten Konzentrationsbereich ab.

Für die MHK-Bestimmung der im Mäusekot enthaltenen *E. coli* Bakterien erfolgte zunächst eine Anzucht dieser Bakterien auf Fluorocult® ECD-Agar. Jeweils eine halbe Kolonie der angezüchteten *E. coli* Bakterien wurde auf Standard-I-Agar als Reinkultur mittels eines fraktionierten Ausstriches angezüchtet. Eine Öse der in Reinkultur auf Standard-I-Agar gewachsenen *E. coli* Bakterien wurde in Mueller-Hinton-Bouillon angezüchtet. Nach 24-stündiger Bebrütung wurde von dieser Bouillon soviel in 5 ml NaCl-Lösung pipettiert, bis eine - dem Mc Farland Standard 0,5 entsprechende - Trübung erreicht wurde. Diese Lösung wurde mit einem sterilen Tupfer auf einem Mueller-Hinton-Nährboden lückenlos ausgestrichen und es wurde ein Tetracyclin Etest®-Streifen aufgelegt, der nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C ausgewertet werden konnte.

Insgesamt wurden auf diese Weise 80 Mäusekotproben untersucht. Es erfolgte pro Maus jeweils eine Untersuchung des Kotes vor Versuchsbeginn (Leerwert) und eine Untersuchung des Kotes vom letzten Versuchstag.

3.3.2 Aufarbeitung des Probenmaterials

I) Anzucht von *E. coli* Bakterien auf Fluorocult® ECD- Agar

Für die Anzucht der im Mäusekot enthaltenen *E. coli*-Isolate wurde Fluorocult® ECD-Agar (*E. coli*-Direkt-Agar; Merck GmbH, 1.04038.0100) verwendet. Dazu wurde 1 g Mäusekot in einen Stomacherbeutel mit Netzeinsatz eingewogen und mit 10 ml NaCl Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde 1 Minute im Stomacher zerkleinert. Von der Erstverdünnung (10^{-1}) wurde im Doppelansatz je 0,1 ml mittels Spatelverfahren auf einen Fluorocult® ECD-Agar aufgetragen. Zur Erstellung der Verdünnungsreihe wurde 1ml dieser Erstverdünnung (10^{-1}) in

10 ml NaCl pipettiert. Diese Lösung wurde gut gevortext und es wurde erneut jeweils 0,1 ml dieser Verdünnungsstufe (10^{-2}) auf einen Fluorocult® ECD-Agar aufgetragen. Von dieser Verdünnungsstufe wurde nochmals 1 ml in 10 ml NaCl Lösung pipettiert. Die Lösung wurde ebenfalls gut gevortext und es wurde ebenso jeweils 0,1 ml dieser Verdünnungsstufe (10^{-3}) auf je einem Fluorocult® ECD -Agar ausgespatelt. Pro Tier wurden also je 2 Ansätze der Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} erstellt. Diese 6 Platten pro Tier wurden 24 Stunden bei 44°C bebrütet. Nach der 24-stündigen Bebrütung erfolgte die Auswertung.

Auswertung:

Nach 24-stündiger Bebrütung erfolgte die Beurteilung der auf dem Fluorocult® ECD -Agar gewachsenen Kolonien in einem abgedunkelten Raum mittels UV-Lampe (Merck GmbH, 1.10203). *E. coli* bildete auf dem ECD-Agar hellblaue Kolonien, die unter UV-Licht von 360 nm fluoreszierten.

Anschließend wurde von jedem der 6 Fluorocult® ECD-Nährböden jeweils eine halbe Kolonie der *E. coli*-Isolate im fraktionierten Ausstrich auf jeweils einen Standard-I-Agar überimpft. Zur Bestätigung wurde an den auf dem Fluorocult® ECD-Agar verbliebenen Koloniehälften noch die Indolprobe durchgeführt. Dazu wurden ca. 10-20 μl KOVACS-Indolreagenz aufgetragen. Eine Rotfärbung nach 2-10 sec zeigte die Indolbildung an (Merck 1996).

Zusammensetzung des Fluorocult® ECD-Agar in g/l:

• Pepton aus Casein	20,0 g
• Lactose	5,0 g
• Natriumchlorid	5,0 g
• Gallesalzmischung	1,5 g
• di-Kaliumhydrogenphosphat	4,0 g
• Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g
• Agar-Agar	15,0 g
• Tryptophan	1,0 g
• 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	0,07 g

Zubereitung des Fluorocult® ECD-Agar:

Es wurden 53,1 g/l des Agarpulver in Aqua dest. gelöst und anschließend 15 min. bei 121 °C autoklaviert. Der pH-Wert wurde bei pH 7,0 +/- 0,2 bei 25 °C eingestellt. Der Agar wurde in Petrischalen ausgegossen und bis zum Erstarren so gelagert. Bis zur Beimpfung erfolgte die Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C.

Der Nährboden wird mittels Spatelverfahren beimpft und 18 bis 24 Stunden bei 44°C bebrütet.

II) Überimpfung auf Standard-I-Agar

Die auf Fluorocult® ECD-Agar festgestellten *E. coli* Isolate wurden zur Reinkultivierung mittels fraktioniertem Ausstrich auf Standard-I-Nähragar (Merck GmbH, 1.07881.0500) überimpft. Für die Überimpfung der Isolate wurde mittels einer abgeflamnten Öse eine halbe Kolonie abgenommen und im fraktionierten Ausstrich auf Standard-I-Nähragar überimpft. Der beimpfte Standard-I-Nähragar wurde für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Zusammensetzung des Standard-I-Nähragar in g/l:

- Pepton 15,0 g
- Hefeextrakt 3,0 g
- Natriumchlorid 6,0 g
- Gallesalzmischung 1,5 g
- D(+)-Glucose 1,0 g
- Agar-Agar 12,0 g

Zubereitung des Standard-I-Nähragar:

Es wurden 37,0 g/l des Agarpulvers in Aqua dest. gelöst und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert. Der pH-Wert wurde bei pH 7,5 +/- 0,2 bei 25 °C eingestellt. Der Agar wurde in Petrischalen ausgegossen und bis zum Erstarren so gelagert. Bis zur Beimpfung erfolgte die Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C.

III) Überimpfung in Mueller-Hinton-Bouillon:

Die auf Standard-I-Agar angezüchteten Isolate wurden zur Vorbereitung der MHK-Bestimmung in Mueller-Hinton-Bouillon (OXOID GmbH, CM 405) überimpft. Hierzu wurde von dem Standard-I-Agar mit einer abgeflamnten Öse eine Kolonie abgenommen und in die Mueller-Hinton-Bouillon überimpft. Die beimpfte Mueller-Hinton-Bouillon wurde 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Zusammensetzung der Mueller-Hinton-Bouillon in g/l:

- Rindfleisch,
getrocknete Infusion aus 300 g 2,0 g
- Caseinhydrolysat 17,5 g
- Stärke 1,5 g

Zubereitung der Mueller-Hinton-Bouillon:

Es wurden 21 g Mueller-Hinton-Bouillon in 1 l Aqua dest. gelöst. Danach erfolgte die Abfüllung zu jeweils 10 ml in verschließbaren Reagenzgläsern. Diese wurden 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der pH-Wert wurde bei pH 7,4 +/- 0,2 bei 25 °C eingestellt. Die Aufbewahrung bis zur Beimpfung erfolgte im Kühlschrank bei + 4 °C.

IV) Beimpfung des Mueller-Hinton-Nährbodens:

Für die Beimpfung des Mueller-Hinton-Nährbodens (OXOID GmbH, CM 337) musste zunächst soviel von der bebrüteten Mueller-Hinton-Bouillon in 5 ml NaCl gegeben werden, bis die Trübung dieser Lösung dem Mc Farland Standard 0,5 (bioMerieux®sa France, 781883801) entsprach. Nach Erreichen der gewünschten Trübung wurde ein steriler Tupfer in die mit Mueller-Hinton-Bouillon versetzte NaCl-Lösung eingetaucht und es erfolgte eine flächige Beimpfung des Mueller-Hinton-Nährbodens.

Zusammensetzung des Mueller-Hinton-Nährboden in g/l:

- Rindfleisch,
getrocknete Infusion aus 300 g 2,0 g
- Caseinhydrolysat 17,5 g
- Stärke 1,5 g
- Agar 17,0 g

Zubereitung des Mueller-Hinton-Nährbodens:

Es wurden 38 g Mueller-Hinton-Nährboden in 1 l Aqua dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt und im Anschluss daran 15 min. bei 121°C autoklaviert. Der pH-Wert wurde bei pH 7,4 +/- 0,2 bei 25 °C eingestellt. Der Mueller-Hinton-Nährboden wurde in Petrischalen ausgegossen und bis zum Erstarren so gelagert. Die Lagerung bis zur Beimpfung erfolgte im Kühlschrank bei +4 °C.

V) Durchführung der MHK-Wert-Bestimmung mittels Etest®

Der Tetracyclin Etest®-Streifen wurde mit einer sterilen Pinzette unter Vermeidung einer Bläschenbildung in der Mitte des frisch beimpften Mueller-Hinton-Nährbodens aufgelegt. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C erfolgte die Auswertung des Testes.

Auswertung der Ergebnisse:

Die Auswertung der Ergebnisse wurde nur an Platten vorgenommen, die Reinkulturen und scharf umrissene Hemmhöfe aufwiesen. Der MHK-Wert wurde an dem Punkt, an dem die Hemmhofelipse den Teststreifen schnitt, abgelesen.

3.4 Bestimmung der Tetracyclin- und Anhydrotetracyclinegehalte in Mäuseurin, Mäusekot und Mäuseknochen mittels LC-ESI-MS-MS

Für die Bestimmung der Tetracyclin- und Anhydrotetracyclin-Gehalte im Mäuseurin, Mäusekot und Mäuseknochen mittels LC-ESI-MS-MS wurden täglich Urinproben der Tiere gesammelt. Die Urinproben wurden tier- und wochenweise gepoolt.

3.4.1 Aufarbeitung des Probenmaterials

Urin:

Die Urinprobe wurde sorgfältig durchmischt. 200 µl Urin wurden dann mit 1 ml Citratpuffer gemischt und anschließend zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Überstände wurden zur Trockene eingedampft und in Acetonitril/Wasser mit 10 mM Ammoniumacetat aufgenommen.

Knochen, Knochenmehl und Kot:

Für die Untersuchung der Kotproben und Oberschenkelknochen wurden Proben jeweils eines Tieres der Gruppen A, C und D verwendet. Für die Untersuchung des Oberschenkelknochens wurden von jedem Tier 100,0 mg Oberschenkelknochen verwendet. Für die Kotanalyse wurden pro Tier jeweils 5,0 g Kot untersucht.

Die Oberschenkelknochen mussten für die Analyse mit Hilfe von Stickstoff in einem Handmörser zerrieben werden. Bei dem untersuchten Knochenmehl handelte es sich um das zu Versuchsbeginn für die Fütterung der Tiere selbst hergestellte Knochenmehl.

Die Proben wurden sorgfältig durchmischt. 100 mg Probe wurden dann mit 1 ml Citratpuffer gemischt und anschließend zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Überstände wurden zur Trockene eingedampft und in Acetonitril/Wasser mit 10 mM Ammoniumacetat aufgenommen.

3.4.2 Durchführung der LC-ESI-MS-MS

Untersuchung von Urinproben, Knochen, Knochenmehlen und Kot auf Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin(CTC) und Anhydrotetracyclin (ATC)

Die Bestimmung der Antibiotika erfolgte nach HPLC-Trennung mittels Elektro-spray-Tandem-massenspektrometrie. Die Identifizierung der Rückstände erfolgte über die Retentionszeit und das Massenspektrum, die Quantifizierung über die intensivsten Fragment-Ionen. Neben den Muttersubstanzen Tetracyclin, Chlortetracyclin und Anhydrotetracyclin wurden die jeweiligen Epimere gemessen und in die Berechnungen einbezogen.

Für die LC-ESI-MS-MS-Untersuchung verwendete Reagenzien und Geräte

Reagenzien

Alle Chemikalien hatten mindestens p. a.-Qualität. Die Fließmittel für die HPLC wiesen Gradientenqualität auf. Das Wasser für die HPLC wurde aus einer Millipore-QF-Anlage entnommen.

- Spüllösung: mit Na₂-EDTA gesättigtes Methanol
- 1 M Citratpuffer (Citronensäuremonohydrat) pH 4,
- NaOH-Plätzchen zur pH-Werteinstellung des Puffers
- Essigsäureethylester
- 90% Acetonitril/10% 100 mM Ammoniumacetatlösung

Geräte

- Laborwaage bzw. Analysenwaage
- Schüttler
- Vortexer
- Variable Pipetten
- Rotationsverdampfer mit Wasserbad
- Zentrifuge
- Ultraschallbad
- pH-Meter
- LCQ-MS
- HPLC-Säule: Puresil RP18, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Waters)

Probenahme und -lagerung

Die Proben wurden nach der Gewinnung beschriftet und bis zur Analyse bei ca. - 20 °C gelagert.

Probenvorbereitung, Messung und Berechnung

Alle für die Probenvorbereitung benötigten Glasgeräte wurden mit Na₂-EDTA-gesättigtem Methanol vorgespült. Es wurden 200 µl (Mäuseurin) bzw. 100 mg (Knochen, Mäusekot) Probenmaterial in ein 10 ml Spitzbodenzentrifugenglas eingewogen, mit 1,2 ml 1 M Citratpuffer (pH 4,7) versetzt und 1 min gevortext. Nach Zugabe von 6 ml

Essigsäureethylester wurde wiederum 1 min gevortext, 15 min auf höchster Stufe geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 min; 1000 g). Der Überstand wurde in einen 25 ml Spitzkolben überführt. Der Rückstand wurde kurz aufgeschüttelt und ein weiteres Mal mit 6 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingengt (Wasserbad 40 °C, 150 ± 10 mbar bis Kolben leer, dann 25 ± 5 mbar). Der Rückstand wurde in 1 mL 90% Acetonitril / 10% 100 mM Ammoniumacetat unter Drehen des Kolbens im Ultraschallbad aufgenommen.

Qualitative und quantitative Bestimmung von Tetracyclinen mit LC-ESI-MS-MS

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Tetracyclinen wurde mittels LC-ESI-MS-MS durchgeführt. Die Analyten wurden an einer RP-C18-Phase mittels eines linearen Gradientensystems (Tab. 8) getrennt. Der Fluß von 1 ml/min wurde vor Einlass in das Massenspektrometer 1:10 gesplittet. Die Kopplung erfolgte über ein Elektrospray-Interface, das im Positivmodus betrieben wurde. Die Analyten wurden an Hand der Retentionszeiten und der substanz-spezifischen Massenspektren qualifiziert und über die Summe der intensivsten Fragment-Ionen durch Vergleich der Peakflächen mit der einer externen Referenzsubstanz quantifiziert. Für alle Substanzen lag der lineare Bereich bei 0,1–10 ng pro Injektion ($r^2 > 0,99$).

HPLC-Parameter:

HPLC-Säule:	Puresil RP18
Flußrate:	1 ml/min
Fließmittel C:	0,5% Ameisensäure und 1 mM Ammoniumacetat in Wasser
Fließmittel D:	Acetonitril
Standardinjektionsvolumen:	8 µl
Detektion:	MS-MS

Tab. 8: Bedingungen für die Fließmittel-Gradienten

Zeit [min]	C [%]	D [%]
0	100	0
1	100	0
10	50	50
11	50	50
12	1	99
15	1	99
16	100	0
24	100	0

Folgende Parameter wurden für die Massenspektrometrie verwendet (Tab. 9):

ESI-Nadel-Spannung:	+5 kV
Trockengas:	Stickstoff
Sheathgas:	100
Auxgas:	0
Temperatur Kapillare:	150 °C

Tab. 9: Parameter der massenspektrometrischen Detektion der Tetracycline

Substanz	[M+H] ⁺ [m/z]	Stoßenergie [%]	Fragment-Ionen [m/z] (rel. Intensität [%])
OTC	461	20	426 (7), 443* (100), 444 (9)
4-Epi-TC**	445	20	410 (6), 427* (100), 428 (13)
TC	445	20	410 (4), 427* (100), 428 (7)
4-Epi-CTC**	479	27	444* (68), 461* (51), 462* (100)
CTC	479	27	444* (51), 461* (54), 462* (100)

*Ionen, die zur Quantifizierung aufsummiert werden

**Quantifizierung erfolgt über TC- bzw. CTC-Referenzsubstanz

Berechnung:

Die Konzentration der Analyten wurde mittels der Methode des externen Standards bestimmt. Die Linearität des Verfahrens im Bereich 0,1–10 ng/Injektion ist gegeben ($r^2 > 0,99$). Die Ergebnisse wurden in $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. mg/kg angegeben.

$$C_R = F_R/F_S \times m_S \times V_{\text{Ges}}/V_{\text{inj}} \times 1/m_P$$

c_R = Konzentration des Analyten [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

F_R = Peakflächeneinheiten Probe

F_S = Peakflächeneinheiten Standard

m_S = Menge Referenzsubstanz [ng]

V_{Ges} = Gesamtvolumen der Probelösung [μl]

V_{inj} = Injektionsvolumen [μl]

m_P = Probeeinwaage [g]

3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau G. Rekhter und Herrn Dr. M. Beyerbach, Institut für Biometrie und Epidemiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Phys. S. Wüstenbecker, Steinfurt.

Die Charakterisierung der im Urin der Versuchstiere ausgeschiedenen TC-Konzentrationen wurde zunächst mit Hilfe einer deskriptiven Statistik durchgeführt.

Für die Berechnung der wochenbezogenen Darstellung (Woche A und Woche C) wurde die im Urin gemessene TC-Konzentration durch die Summe der jeweils pro Woche aufgenommenen TC-Menge dividiert. Aus diesen Werten wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichungen berechnet, so dass die Darstellung des Fehlerindikators möglich war.

Die Ermittlung der Werte für die Darstellung der insgesamt aufgenommenen Menge TC wurde folgendermaßen durchgeführt: Die im Urin gemessene TC-Konzentration wurde durch die insgesamt aufgenommene Menge TC dividiert. Aus den berechneten Werten wurden ebenfalls Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen gebildet, so dass auch hier die Darstellung des Fehlerindikators möglich war.

Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) wurde für jede Woche einzeln geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A (Knochenmehlfütterung) und Gruppe C (orale Behandlung mit TC-Reinsubstanz) vorlagen. Diese Analyse erfolgte zum einen bezogen auf die aufgenommene Wochenmenge TC und zum anderen auf die aufgenommene Gesamtmenge TC.

Für die Etest®-Ergebnisse der Mäuse der Gruppe B (Kontrollgruppe) wurde der Anstieg des Messwertes als mittlere Differenz zwischen Etest® 0 und dem Mittelwert aus Etest® 1-6 ermittelt. Die dazugehörige Varianz (=Quadrat der Standardabweichung) wurde ebenfalls bestimmt. Die Differenz wurde als Offset (=0,17) von den für jede Maus einzeln berechneten Mittelwerten aus Etest® 1-6 subtrahiert. Die Varianzen (=0,02) wurden addiert (Gauss' sches Fehlerfortpflanzungsgesetz). Mit dem Offset wird dem Ergebnis Rechnung getragen, dass bei Etest® 1-6 die Werte offensichtlich durchweg etwas höher liegen. Die berechnete Varianz wurde auch für Etest® 0 angenommen, weil für alle Etests® etwa die gleiche Varianz zu

erwarten ist. Mittels einseitigem T-Test mit bekannten Varianzen wurde die statistische Größe z für jede Maus einzeln berechnet, deren Betrag kleiner als das kritische z ($\alpha = 0,05$) bleiben muss, um eine signifikante Erhöhung des Messwertes auszuschließen. Beim T-Test wurde also die Hypothese geprüft, ob die Differenz zwischen Etest® 0 und den mit Offset versehenen Mittelwerten aus Etest® 1-6 signifikant von 0 verschieden ist. Mit der Berechnung für jede einzelne Maus wurde geprüft, ob eine signifikante MHK-Wert-Änderung bei einer der Mäuse stattgefunden hat. Dieser Einzelwert würde sonst in der Mittelwertbildung über alle Tiere eventuell untergehen.

4 Ergebnisse

4.1 Tetracyclin-Gehalte von im Labor hergestellten Knochenmehl

4.1.1 Mittlere Wiederfindungsraten der angewendeten Methoden

Alle Substanznachweise konnten über UV-Spektren abgesichert werden. Es wurden folgende mittlere **Wiederfindungsraten** der angewendeten Methoden zur Extraktion von Tetracyclinen aus Knochen ermittelt (Tab. 10):

**Tab. 10: Mittlere Wiederfindungsraten für Tetracyclin aus Knochen
(Angaben in %)**

Tetracyclin	Wiederfindungsrate Mittelwert ± Standardabweichung
OTC	66,1 ± 4,13
TC	65,5 ± 3,07
e-TC	60,1 ± 1,12
ATC	46,0 ± 1,37
e-ATC	43,8 ± 2,71
CTC	56,3 ± 8,10
e-CTC	48,7 ± 1,78

4.1.2 Ergebnisse der Tetracyclinbestimmung aus dem Knochenmehl

Mit einem einmaligen Aufschluss des Knochenmehls in 1 M HCL konnte eine vollständige Extraktion der gebundenen Tetracyclin-Rückstände nicht erreicht werden (Tabelle 13). Für die Erfassung aller gebundenen Tetracyclin-Rückstände war eine zweimalige Extraktion

notwendig (Tabelle 14). Weitere Extraktionen ergaben keine Erhöhung der bestimm-
baren Konzentrationen.

In Tabelle 11 sind die Tetracyclin-Gehalte des Knochenmehls dargestellt, die nach einmaliger
Extraktion mittels 1 M HCL nachgewiesen werden konnten. Die Bestimmung der
Tetracyclin-Gehalte erfolgte mittels HPLC.

**Tab. 11: Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Knochenmehls nach dem
1. Extraktionstag (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung
der Wiederfindungsraten, n=3)**

	Mittelwert	Standard- Abweichung	Minimum	Maximum
OTC	320,6	158,1	216,8	502,5
e-TC	2047,3	934,7	975,0	2689,6
TC	4073,2	2965,0	2189,9	7490,9
CTC	2843,6	1456,8	1492,1	4386,7
e-CTC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
ATC	1160,4	387,1	826,4	1584,7
e-ATC	385,2	132,7	261,6	525,5
ACTC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Nach dem zweiten Extraktionstag konnten die Tetracyclin-Gehalte vollständig erfasst werden (Tab. 12).

Tab. 12: Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Knochenmehls nach dem 2. Extraktionstag (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten, n=4)

	Mittelwert	Standard- Abweichung	Minimum	Maximum
OTC	523,3	90,7	417,9	628,1
e-TC	2777,7	695,9	1844,3	3469,3
TC	7361,3	1946,5	4834,9	8217,5
CTC	5938,5	1026,8	4466,9	6805,3
e-CTC	2522,8	-	-	-
ATC	5600,0	1130,4	4232,9	6925,4
e-ATC	1835,8	417,3	1392,1	2382,6
ACTC	61,7	11,1	53,8	69,5

Zusätzlich zu den HPLC-Messungen wurde zur qualitativen Absicherung eine einmalige Bestimmung mittels LC-ESI-MS-MS durchgeführt. Diese Messung ergab keine vollständige Übereinstimmung der Konzentrationen. Auffällig war ferner, dass OTC mittels LC-ESI-MS-MS nicht nachweisbar war.

In Tabelle 13 werden die Tetracyclin-Gehalte des Knochenmehls nach dem **1. Extraktionstag**, nach dem **2. Extraktionstag** und die mittels **LC-ESI-MS-MS** bestimmten Tetracyclin-Gehalte vergleichend dargestellt.

Tab. 13: Gemessener Gesamtgehalt von OTC (nur OTC), TC (Summe aus e-TC, TC, e-ATC, ATC) und CTC (Summe aus e-CTC, CTC, e-ACTC, ACTC) angegeben in µg/kg (Mittelwerte und Standardabweichungen)

	1. Extraktionstag HPLC	2. Extraktionstag HPLC	Messung mittels LC-ESI-MS-MS
OTC	320,6 ± 158,1	523,3 ± 90,7	Nicht nachweisbar
TC (TC + e-TC + ATC + e-ATC)	7666,1 ± 3135,7	17574,8 ± 2392,7	14040,0
CTC (CTC + e-CTC + ACTC)	2843,6 ± 1456,8	8523,0 ± 1026,9	4700,0
Gesamt	10830,3 ± 3461,2	26621,1 ± 2605,4	18740,0

Für die nachfolgenden Berechnungen der Bioverfügbarkeit wurden die HPLC-Messergebnisse (2. Extraktionstag) zugrunde gelegt.

4.2 Tetracyclin- und Anhydrotetracyclinegehalte in Mäuseurin, Mäusekot und Mäuseknochen

Die **mittlere Wiederfindungsrate** für Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin (CTC) und Anhydrotetracyclin (ATC) in Mäuseurin im untersuchten Konzentrationsbereich von 50 - 1000 µg/L betrug für TC: 101,8 %, für CTC: 117,0 % und für ATC: 88,0 % (Tab.14).

Tab. 14: Mittlere Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Tetracyclin in Mäuseurin (Angaben in %)

Tetracyclin	Wiederfindungsrate aus Mäuseurin [%]	Bestimmungs- grenze [µg/L]	Nachweisgrenze [µg/L]
TC	101,8	30	10
CTC	117,0	50	20
ATC	88,0	50	20

Die **Bestimmungsgrenze** betrug für TC: 30µg/L, für CTC: 50 µg/L und für ATC: 50µg/L. Die **Nachweisgrenze** betrug für TC: 10µg/L, für CTC: 20 µg/L und für ATC: 20µg/L. Befunde, die zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen, wurden bei Übereinstimmung der Retentionszeit und des Massenspektrums über den externen Standard quantifiziert.

4.2.1 TC-, CTC- und ATC-Konzentrationen in Mäuseurin

In den folgenden tabellarischen Aufstellungen sind die mittels LC-ESI-MS-MS nachgewiesenen TC-, CTC- und ATC- Gehalte der Mäuseurinproben der Gruppen A, C und D dargestellt. Die Urinproben der Mäuse der Gruppe B wurden nicht analysiert, da diese Gruppe als Vergleichsgruppe für den mikrobiologischen Teil dieser Studie diente.

Versuchsgruppe A (mit Knochenmehl gefüttert)

Bei den 10 Versuchstieren konnte überwiegend bereits in der ersten Woche Tetracyclin (im Folgenden als Summe aus TC und e-TC dargestellt) im Urin nachgewiesen werden. Dabei konnten starke individuelle Schwankungen beobachtet werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 10,2 und 161,4 µg/L in der ersten Versuchswoche und 32,3 und 200,4 µg/L in der dritten Versuchswoche. Lediglich bei einem der Versuchstiere konnte eine Ausscheidung von Tetracyclin über den Urin nicht nachgewiesen werden, da die für eine Messung erforderliche Probenmenge nicht gewonnen werden konnte. Messbare Konzentrationen von CTC (im Folgenden als Summe aus CTC und e-CTC dargestellt) wurden bei vier Versuchstieren nachgewiesen. Die Konzentrationen lagen zwischen 20,5 und 46,4 µg/L. ATC ist in keiner der untersuchten Proben nachweisbar gewesen.

In Tabelle 15 sind die TC-Gehalte der Urinproben der Gruppe A in µg/L dargestellt.

Tab. 15: Gruppe A: LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse der Urinproben nach Fütterung mit Knochenmehl (= nicht analysiert, zu geringes Probenvolumen; n.n. = nicht nachweisbar)**

Maus-Nr.:	Woche	TC [µg/L] gemessen	CTC [µg/L] gemessen	ATC [µg/L] gemessen
	Sammelurin vor der Fütterung	n.n.	n.n.	n.n.
001	Woche 1	10,2	n.n.	n.n.
001	Woche 2	29,1	n.n.	n.n.
001	Woche 3	60,9	n.n.	n.n.

Ergebnisse

002	Woche 1	79,2	n.n.	n.n.
002	Woche 2	49,3	n.n.	n.n.
002	Woche 3	33,4	n.n.	n.n.
003	Woche 1	n.n.	n.n.	n.n.
003	Woche 2	25,8	n.n.	n.n.
003	Woche 3	32,3	n.n.	n.n.
004	Woche 1	52,8	n.n.	n.n.
004	Woche 2	43,5	n.n.	n.n.
004	Woche 3	41,6	n.n.	n.n.
005	Woche 1	97,7	20,5	n.n.
005	Woche 2	105,4	n.n.	n.n.
005	Woche 3	58,1	n.n.	n.n.
006	Woche 1	72,7	20,8	n.n.
006	Woche 2	82,4	23,5	n.n.
006	Woche 3	75,7	n.n.	n.n.
007	Woche 1	79,6	n.n.	n.n.
007	Woche 2	42,3	n.n.	n.n.
007	Woche 3	61,2	n.n.	n.n.
009	Woche 1	101,6	24,0	n.n.
009	Woche 2	**	**	**
009	Woche 3	112,7	n.n.	n.n.
010	Woche 1	161,4	46,4	n.n.
010	Woche 2	161,2	24,7	n.n.
010	Woche 3	200,4	36,5	n.n.

Versuchsgruppe C (nach oraler Applikation von TC-Reinsubstanz)

Aufgrund individueller Fress- und Harnabsatzgewohnheiten der Tiere konnten geeignete Harnproben nur von 7 Versuchstieren gewonnen werden. Bei diesen Tieren konnten ausschließlich Tetracyclin und sein 4-Epimer (im Folgenden als Summe aus TC und e-TC dargestellt) im Urin nachgewiesen werden. Wie bereits bei Gruppe A dargelegt konnten starke individuelle Schwankungen beobachtet werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 109,4 und 323,3 µg/L in der ersten Versuchswoche und 311,1 und 1154,5 µg/L in der dritten Versuchswoche.

In Tabelle 16 sind die Tetracyclin-Gehalte der Urinproben der Gruppe C in µg/L dargestellt.

Tab. 16: Gruppe C: LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse der Urinproben nach oraler Behandlung mit Tetracyclin-Reinsubstanz (= nicht analysiert, zu geringes Probenvolumen)**

Maus-Nr.	Woche	TC [µg/L]
	Sammelurin vor der Fütterung	n.n.
001	Woche 1	156,7
001	Woche 2	441,5
001	Woche 3	457,4
003	Woche 1	283,1
003	Woche 2	**
003	Woche 3	**
006	Woche 1	332,3
006	Woche 2	227,1
006	Woche 3	696,1

Ergebnisse

007	Woche 1	121,5
007	Woche 2	279,6
007	Woche 3	399,1
008	Woche 1	149,2
008	Woche 2	293,1
008	Woche 3	328,1
009	Woche 1	109,4
009	Woche 2	239,4
009	Woche 3	311,1
010	Woche 1	189,6
010	Woche 2	614,9
010	Woche 3	1154,5

Versuchsgruppe D (nach oraler Applikation von ATC-Reinsubstanz)

Aufgrund individueller Fress- und Harnabsatzgewohnheiten der Tiere konnten geeignete Harnproben nur von 8 Versuchstieren gewonnen werden. Bei 4 Tieren konnten Anhydrotetracyclin und sein 4-Epimer (im Folgenden als Summe aus ATC und e-ATC dargestellt) im Urin nachgewiesen werden. Die festgestellten Konzentrationen lagen zwischen 22,7 und 50,1 µg/L.

In Tabelle 17 sind die Anhydrotetracyclin-Gehalte der Urinproben der Gruppe D in µg/L dargestellt.

Tab. 17: Gruppe D: LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse der Urinproben nach oraler Behandlung mit Anhydrotetracyclin-Reinsubstanz (n.n. = nicht nachweisbar)

Maus-Nr.	Woche	ATC [$\mu\text{g/L}$]
012	Woche 1	n.n.
012	Woche 2	50,1
012	Woche 3	29,4
014	Woche 1	22,7
014	Woche 2	n.n.
014	Woche 3	36,3
015	Woche 1	n.n.
015	Woche 2	23,8
015	Woche 3	35,1
019	Woche 1	n.n.
019	Woche 2	23,5
019	Woche 3	n.n.

4.2.2 Futteraufnahme-Mengen der Versuchstiere aus Gruppe A

Die Versuchstiere der Gruppe A, denen über das Futter tetracyclinhaltiges Knochenmehl angeboten wurde, nahmen unterschiedliche Mengen dieses Futters auf. Durch sorgfältiges Wiegen konnte ermittelt werden, welche Mengen des Futtermittels und der gesuchten Tetracyclin-Derivate die einzelnen Tiere rechnerisch aufgenommen haben. Diese Aufnahmemengen wurden für die folgenden Vergleichsberechnungen herangezogen.

In Anhang 9.2, Tab. II sind die Futtermengen dargestellt.

4.2.3 Ermittlung des Anteils des über den Urin ausgeschiedenen Tetracyclins an der aufgenommenen / applizierten Menge

Versuchsgruppe A (mit Knochenmehl gefüttert)

Durch die LC-ESI-MS-MS Messungen konnten absolute Tetracyclin-Konzentrationen im Urin bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der tatsächlich aufgenommenen Tetracyclin-Mengen aus dem Knochenmehl [A] und der aufgefangenen sowie untersuchten Urinmenge [X] wurde ermittelt, wie viel Tetracyclin absolut [B] und relativ bezogen auf die Aufnahmemenge über den Urin ausgeschieden wurde.

Der Anteil des über den Urin ausgeschiedenen Tetracyclins an der Gesamtaufnahmemenge betrug zwischen 0,11 und 2,12 % (Tabelle 18). Der Mittelwert über alle Tiere/Wochen betrug 0,40 % bei einer Standardabweichung von 0,27.

Tab. 18: Oral aufgenommenes Tetracyclin (als Summe aus Tetracyclin und e-Tetracyclin), aufgefangene Urinmenge, sowie absolut und relativ über den Urin ausgeschiedene Tetracyclin-Anteile für Tiere der Gruppe A (= nicht analysiert, zu geringes Probenvolumen; n.n. = nicht nachweisbar)**

Maus	Wo.	Über das Futter absolut aufgenommene Menge TC (μg) [A]	Urin (ml) [X]	TC in Urin ($\mu\text{g/L}$)	Absolut ausgeschiedenes TC ($\mu\text{g/x ml}$) [B]	Relativ ausgeschiedenes TC [B/A] (%)
1	1	24,65	2,53	10,20	0,03	0,12
	2	42,29	2,96	29,10	0,09	0,21
	3	65,00	2,31	60,90	0,14	0,21

Ergebnisse

2	1	76,11	7,02	79,20	0,56	0,73
	2	72,23	9,55	49,30	0,47	0,65
	3	73,10	7,39	33,40	0,25	0,34
3	1	27,91	13,28	n.n.		
	2	80,61	6,81	25,80	0,18	0,22
	3	77,53	6,90	32,30	0,22	0,28
4	1	53,02	5,21	52,80	0,28	0,53
	2	77,79	3,55	43,50	0,15	0,19
	3	76,09	3,92	41,60	0,16	0,21
5	1	69,75	6,35	97,70	0,62	0,88
	2	49,45	4,56	105,40	0,48	0,97
	3	51,36	2,66	58,10	0,15	0,29
6	1	75,06	6,56	72,70	0,48	0,63
	2	55,80	3,03	82,40	0,25	0,44
	3	40,35	3,49	75,70	0,26	0,64
7	1	73,97	3,32	79,60	0,26	0,35
	2	81,86	1,00	42,30	0,04	0,05
	3	79,57	1,47	61,20	0,09	0,11
9	1	73,42	4,94	101,60	0,50	0,68
	2	79,21	0,15	**		
	3	83,57	0,77	112,70	0,09	0,11
10	1	68,26	8,10	161,40	1,31	1,91
	2	67,38	6,63	161,20	1,07	1,59
	3	56,03	5,94	200,40	1,19	2,12

Versuchsgruppe C (nach oraler Applikation von TC-Reinsubstanz)

Durch LC-ESI-MS-MS-Messungen konnten absolute Tetracyclin-Konzentrationen im Urin bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der aufgefangenen sowie untersuchten Urinmenge ist ermittelt worden, wie viel Tetracyclin absolut und relativ bezogen auf die Aufnahmemenge über den Urin ausgeschieden wurde.

Der Anteil, des über den Urin ausgeschiedenen Tetracyclins an der Gesamtaufnahmemenge betrug zwischen 0,20 und 2,87 % (Tabelle 19) Der Mittelwert über alle Tiere/Wochen betrug 1,32 % bei einer Standardabweichung von 0,75.

Tab. 19: Gruppe C: Oral appliziertes Tetracyclin, aufgefangene Urinmenge, sowie absolut und relativ über den Urin ausgeschiedene Tetracyclin-Anteile (als Summe aus Tetracyclin und e-Tetracyclin für Tiere der Gruppe C (= nicht analysiert, zu geringes Probenvolumen)**

Maus	Wo.	Oral applizierte Menge TC (µg) [A]	Urin (ml) [X]	TC in Urin (µg/L)	Absolut ausgeschiedenes TC (µg/x ml) [B]	Relativ ausgeschiedenes TC [B/A] (%)
1	1	100,0	9,11	156,70	1,43	1,43
	2	100,0	5,20	441,50	2,30	1,15
	3	100,0	4,62	457,40	2,11	2,11
3	1	100,0	1,66	283,10	0,47	0,47
	2	100,0	1,75	**		
	3	100,0	2,00	**		

Ergebnisse

6	1	100,0	1,92	332,30	0,64	0,64
	2	100,0	0,89	227,10	0,20	0,20
	3	100,0	1,36	696,10	0,95	0,95
7	1	100,0	4,83	121,50	0,59	0,59
	2	100,0	4,21	279,60	1,18	1,18
	3	100,0	7,12	399,10	2,84	2,84
8	1	100,0	4,67	149,20	0,70	0,70
	2	100,0	3,92	293,10	1,15	1,15
	3	100,0	4,26	328,10	1,40	1,40
9	1	100,0	7,96	109,40	0,87	0,87
	2	100,0	5,87	239,40	1,41	1,41
	3	100,0	4,21	311,10	1,31	1,31
10	1	100,0	7,29	189,60	1,38	1,38
	2	100,0	4,67	614,90	2,87	2,87
	3	100,0	2,03	1154,50	2,34	2,34

Versuchsgruppe D (nach oraler Applikation von ATC-Reinsubstanz)

Durch die LC-ESI-MS-MS-Messungen konnten absolute Anhydrotetracyclin-Konzentrationen im Urin bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der aufgefangenen sowie untersuchten Urinmenge konnte ermittelt werden, wie viel ATC absolut und relativ bezogen auf die Aufnahmemenge über den Urin ausgeschieden wurde.

Der Anteil des über den Urin ausgeschiedenen ATC an der Gesamtaufnahmemenge betrug zwischen 0,05 und 0,14 % (Tabelle 20) Der Mittelwert über alle Tiere/Wochen betrug 0,08 % bei einer Standardabweichung von 0,03.

Tab. 20: Gruppe D: Oral appliziertes Anhydrotetracyclin, aufgefangene Urinmenge, sowie absolut und relativ über den Urin ausgeschiedene Anhydrotetracyclin-Anteile (als Summe aus ATC und e-ATC) für Tiere der Gruppe D (n.n. = nicht nachweisbar)

Maus	Wo.	Oral applizierte Menge ATC (µg) [A]	Urin (ml) [X]	ATC in Urin (µg/L)	Absolut ausgeschiedenes ATC (µg/x ml) [B]	Relativ ausgeschiedenes ATC [B/A] (%)
12	1	100,0	5,60	n.n.		
	2	100,0	2,06	50,10	0,10	0,10
	3	100,0	1,65	29,40	0,05	0,05
14	1	100,0	4,12	22,70	0,09	0,09
	2	100,0	1,71	n.n.		
	3	100,0	1,93	36,30	0,07	0,07

Ergebnisse

15	1	100,0	4,41	n.n.		
	2	100,0	3,41	23,80	0,08	0,08
	3	100,0	1,32	35,10	0,05	0,05
19	1	100,0	5,38	n.n.		
	2	100,0	5,97	23,50	0,14	0,14
	3	100,0	4,33	n.n.		

4.2.4 Vergleich der TC-Ausscheidung der Gruppen A und C bezogen auf die pro Woche aufgenommene Menge TC und auf die insgesamt aufgenommene Menge TC

Der direkte Vergleich der Ergebnisse der Gruppen A und C erlaubt eine Einschätzung der sekundären Bioverfügbarkeit oral aufgenommener, gebundener Tetracycline. Die Tiere der Versuchsgruppe C, denen oral Tetracyclin verabreicht worden waren, schieden im Mittel 1,32 % des applizierten Wirkstoffes über den Urin aus (siehe oben).

Die Tiere der Gruppe A, die gebundene Tetracycline aufgenommen hatten, schieden lediglich 0,40 % des aufgenommenen Tetracyclins über den Urin aus. Bezogen auf die Ausscheidungsrate der Tiere der Gruppe C waren es 30,3 %.

Vergleicht man die Tetracyclin-Aufnahmen und -Ausscheidungen für die Gruppen A und C getrennt nach Untersuchungswochen sowie über den gesamten Untersuchungszeitraum ergibt sich folgendes Bild (Abb. 4).

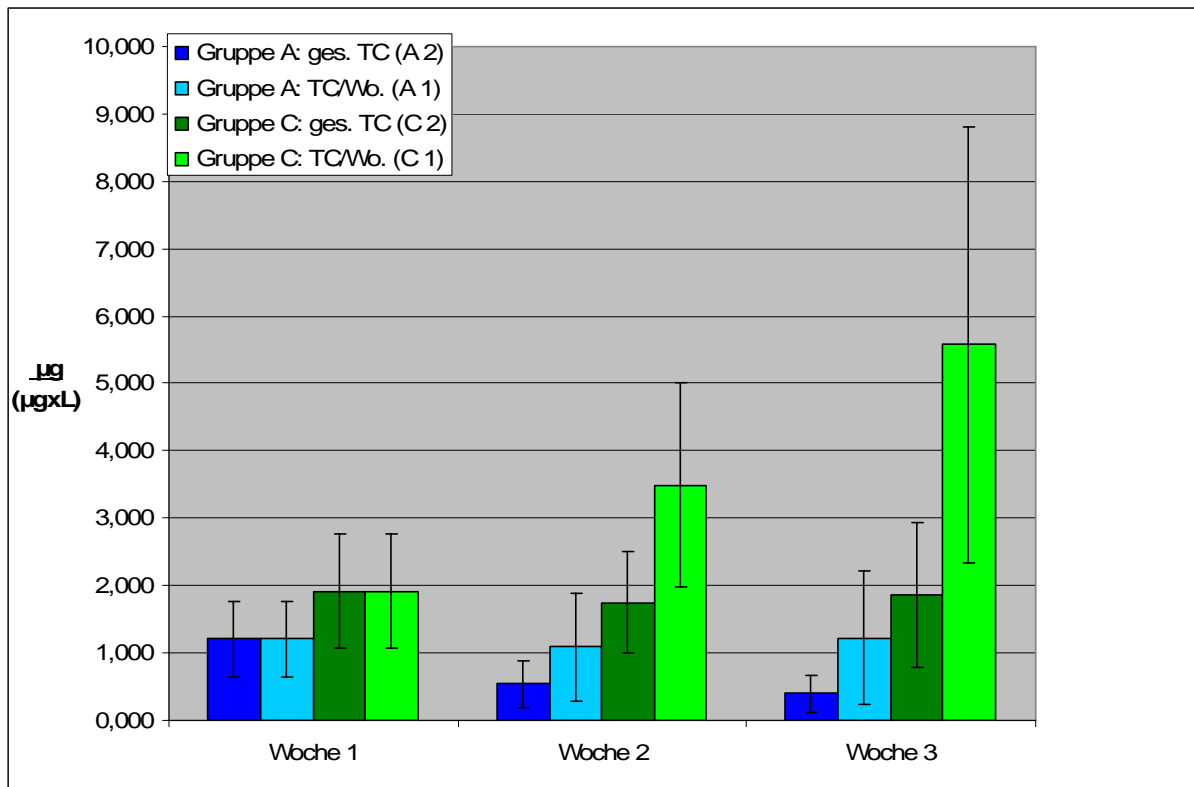


Abb. 4: Tetracyclin (als Summe aus TC und e-TC) im Urin der Versuchstiere von Gruppe A und C (Mittelwerte & Standardabweichungen)

Gruppe A 1: TC-Konzentration im Urin dividiert durch die Summe der jeweils pro Woche aufgenommenen TC-Menge (n=9) der Tiere der Gruppe A (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe A 2: TC-Konzentration im Urin dividiert durch die Summe der insgesamt bis zum Messzeitpunkt aufgenommenen TC-Menge (n=9) der Tiere der Gruppe A (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe C 1: TC-Konzentration im Urin dividiert durch die Summe der jeweils pro Woche aufgenommenen TC-Menge (n=7) der Tiere der Gruppe C (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe C 2: TC-Konzentration im Urin dividiert durch die Summe der insgesamt bis zum Messzeitpunkt aufgenommenen TC-Menge (n=7) der Tiere der Gruppe C (Mittelwert und Standardabweichung)

Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass bei den Mäusen der Gruppe A (Knochenmehlfütterung) die TC-Ausscheidung bezogen auf die wöchentliche TC-Aufnahme (Woche A) relativ konstant bleibt (türkise Balken), die TC-Ausscheidung bezogen auf die insgesamt aufgenommene Menge (Gesamt A) dagegen abfällt (blaue Balken).

Bei den Versuchstieren der Gruppe C (tägliche orale Gabe von 20 µg TC) ist die TC-Ausscheidung bezogen auf die insgesamt oral verabreichte Menge TC relativ konstant (dunkelgrüne Balken). Die TC-Ausscheidung bezogen auf die wöchentlich aufgenommene Menge TC steigt hingegen deutlich an (hellgrüne Balken).

4.2.5 Vergleich der über den Urin erfolgten Ausscheidung von ATC (Gruppe D) im Vergleich zu der Ausscheidung von TC (Gruppe C)

Da bei den Versuchstieren der Gruppe D nicht in jedem Fall ATC im Urin nachweisbar war, ist die Datenmenge für einen Vergleich der Ausscheidung von TC und ATC relativ dünn. Die ATC-Urinausscheidung, bezogen auf die insgesamt applizierte Menge betrug lediglich 0,08%. Relativ zur TC-Ausscheidung der Tiere der Versuchsgruppe C betrug sie 6,1%.

4.2.6 Statistische Auswertung der mittels LC-ESI-MS-MS festgestellten TC-Gehalte im Mäuseurin

Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) wurde für jede Woche einzeln geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A (Knochenmehlfütterung) und Gruppe C (orale Behandlung mit TC-Reinsubstanz) vorliegen. Diese Analyse erfolgte zum einen bezogen auf die aufgenommene Wochenmenge und zum anderen auf die aufgenommene Gesamtmenge. Geprüft wurden die auf die aufgenommene Menge normierten TC-Konzentrationen aller Mäuse der Gruppen A und C auf die hypothetische Differenz der Mittelwerte = 0. Die Analyse der in der ersten Woche aufgenommenen Menge und der bis dahin aufgenommenen Gesamtmenge ist identisch. Unterschiede treten erst ab der zweiten Woche auf, da hier gegenüber der Wochenmenge der zweiten Woche die bis dahin insgesamt aufgenommene Menge (Woche 1 und Woche 2) steht. Gleiches gilt für die dritte Woche (Woche 3 einzeln gegenüber Gesamtmenge Woche 1-3).

Wenn bei der Analyse die erhaltene Prüfgröße F kleiner als der kritische F -Wert ist, sind die Mittelwerte nicht signifikant unterschiedlich.

In der nachfolgenden statistischen Auswertung ist erkennbar, dass in der Analyse für die erste Woche (Wochenmenge und Gesamtmenge = identisch) keine signifikanten Unterschiede auftraten (Tab. 21). Erst in der 2. und 3. Woche fanden sich signifikante Unterschiede sowohl beim Vergleich der Wochenmengen als auch der bis dahin aufgenommenen Gesamtmengen (Tab. 22).

Tab. 21: Statistische Auswertung der LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse nach Normierung auf die aufgenommene Wochenmenge

Für Normierung auf Wochenmenge					
ANOVA					
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,89	1	1,89	3,80	0,07
Innerhalb der Gruppen	6,47	13	0,50		
Gesamt	8,36	14			nicht signifikant
ANOVA					
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	19,70	1	19,70	14,89	0,00
Innerhalb der Gruppen	15,87	12	1,32		
Gesamt	35,56	13			signifikant

Für Normierung auf Wochenmenge					
ANOVA					
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,89	1	1,89	3,80	0,07
Innerhalb der Gruppen	6,47	13	0,50		
Gesamt	8,36	14			nicht signifikant
ANOVA					
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	19,70	1	19,70	14,89	0,00
Innerhalb der Gruppen	15,87	12	1,32		
Gesamt	35,56	13			signifikant

Für Normierung auf Wochenmenge					
ANOVA					
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,89	1	1,89	3,80	0,07
Innerhalb der Gruppen	6,47	13	0,50		
Gesamt	8,36	14			nicht signifikant
ANOVA					
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	19,70	1	19,70	14,89	0,00
Innerhalb der Gruppen	15,87	12	1,32		
Gesamt	35,56	13			signifikant

Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse

Woche 3

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
Gruppe A	9	11,06	1,23	1,00
Gruppe C	6	33,46	5,58	10,48

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	68,07	1	68,07	14,66	0,00	4,67
Innerhalb der Gruppen	60,38	13	4,64			
Gesamt	128,45	14				

signifikant

Tab. 22: Statistische Auswertung der LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse nach Normierung auf die aufgenommene Gesamtmenge

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Gruppe A	8	9,64	1,21	0,31		
Gruppe C	7	13,42	1,92	0,71		
ZUSAMMENFASSUNG						
ANOVA						
Streuungsursache						
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,89	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Innerhalb der Gruppen	6,47	13	0,50	3,80	0,07	4,67
Gesamt	8,36	14				nicht signifikant.
ANOVA						
Streuungsursache						
Unterschiede zwischen den Gruppen	5,00	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Innerhalb der Gruppen	3,66	12	0,30	16,39	0,00	4,75
Gesamt	8,66	13				signifikant.

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Gruppe A	8	4,31	0,54	0,12		
Gruppe C	6	10,48	1,75	0,57		
ZUSAMMENFASSUNG						
ANOVA						
Streuungsursache						
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,89	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Innerhalb der Gruppen	6,47	13	0,50	3,80	0,07	4,67
Gesamt	8,36	14				nicht signifikant.

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Gruppe A	8	4,31	0,54	0,12		
Gruppe C	6	10,48	1,75	0,57		
ZUSAMMENFASSUNG						
ANOVA						
Streuungsursache						
Unterschiede zwischen den Gruppen	5,00	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Innerhalb der Gruppen	3,66	12	0,30	16,39	0,00	4,75
Gesamt	8,66	13				signifikant.

Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse

Woche 3

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
Gruppe A	9	3,55	0,39	0,08
Gruppe C	6	11,15	1,86	1,16

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	7,72	1	7,72	15,61	0,00	4,67
Innerhalb der Gruppen	6,43	13	0,49			
Gesamt	14,15	14				

signifikant.

4.2.7 Tetracyclin-, Chlortetracyclin und Anhydrotetracyclingehalte in Mäuseknochen und Mäusekot

Von jeweils einem Tier der Versuchsgruppen A, C und D wurde ein Knochen (Os femoris) und die zu dem Tier gehörende Kotprobe mittels LC-ESI-MS-MS auf Tetracycline untersucht.

Untersuchung der Oberschenkelknochen

In Tabelle 23 sind die gemessenen TC-Konzentrationen der Oberschenkelknochen (Summe aus Muttersubstanz und Epimer) ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dargestellt.

Tab. 23: TC-, CTC- und ATC-Gehalte der Oberschenkelknochen (Summe aus Muttersubstanz und Epimer) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Proben-Nr.	Probe	TC	CTC	ATC
096	Maus 10 Gruppe A	n.n.	n.n.	n.n.
097	Maus 10 Gruppe C	221,0	n.n.	n.n.
098	Maus 12 Gruppe D	n.n.	n.n.	n.n.

Aus dem ermittelten TC-Gehalt des Oberschenkelknochens lässt sich – unter Annahme eines einheitlichen TC-Gehaltes aller Knochen – bei einem Gesamtgewicht des Knochengewebes dieser Maus von etwa 2,54 g (= 0,56 μg TC absolut) und einer oralen Gesamtaufnahme von 300,0 μg TC ein prozentualer Anteil von 0,19 % für die im Skelett der Maus gespeicherte Tetracyclin-Menge bezogen auf die applizierte Menge berechnen.

Untersuchung der Kotproben

Bei dem mit Knochenmehl gefütterten Tier (Gruppe A) konnten bis auf Oxytetracyclin alle Tetracycline und Umwandlungsprodukte, die auch im Futtermittel enthalten waren,

nachgewiesen werden. Der Gehalt an Tetracyclin (TC & e-TC) betrug 16.540 µg/kg, was mit etwa 94 % des TC-Gehaltes im Knochenmehl entspricht. Der Gehalt an CTC (CTC & e-CTC) betrug 4.660 µg/kg, was mit 55,1 % nur etwa der Hälfte des im Knochenmehl vorhandenen Gehaltes ausmacht. ATC (ATC & e-ATC) wurde in einer Konzentration von 290 µg/kg nachgewiesen. Ein Vergleich mit dem Gehalt im Knochenmehl ist nicht möglich, da ATC während der HCl-Extraktion der Knochen artefiziell aus TC entsteht.

Im Kot der Maus aus Gruppe D wurde ausschließlich ATC (ATC & e-ATC) in einer Konzentration von 3.360 µg/kg nachgewiesen.

Im Vergleich der Tetracyclin-Gehalte im Kot nach oraler Applikation gleicher Mengen an TC (Gruppe C) und ATC (Gruppe D) fällt auf, dass diese bei ATC-Applikation um ca. 90 % niedriger liegen.

Für die Messung der Kotproben wurden von jeder Maus 5 g Kot (etwa 23 % des insgesamt während des Versuchszeitraumes abgesetzten Kotes) aufgearbeitet. In diesen Proben sind folgende absolute Gehalte nachgewiesen worden:

Maus 10 Gruppe A: 82,7 µg TC, 23,3 µg CTC und 1,45 µg ATC

Dies entspricht einer rechnerischen Ausscheidung von 43,6 % der insgesamt aufgenommenen TC-Menge und 25,3 % der insgesamt aufgenommenen CTC-Menge

Maus 10 Gruppe C: 155,2 µg TC und 0,5 µg ATC

Dies entspricht einer rechnerischen Ausscheidung von 51,7 % der insgesamt applizierten TC-Menge.

Maus 12 Gruppe D: 16,8 µg ATC

Dies entspricht einer rechnerischen Ausscheidung von 5,6 % der insgesamt applizierten ATC-Menge.

4.3 MHK-Werte für Tetracyclin bei *E. coli* aus Mäusekot

Für die Bestimmung der MHK-Werte für Tetracyclin bei *E.coli-Isolaten* in Mäusekot wurde vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende von jeder Maus aus Gruppe A, B, C und D eine Kotprobe mittels Etest® untersucht.

Sowohl vor Versuchsbeginn als auch nach Versuchsende wurden ausschließlich MHK-Werte festgestellt, die die Isolate als sensibel gegenüber Tetracyclinen auswiesen. Die MHK-Werte lagen überwiegend unter 1 µg/ml.

Während des Versuchsablaufes kam es bei allen Gruppen – einschließlich der unbehandelten Kontrollgruppe B – zu einer geringfügigen Zunahme der MHK-Werte (Abb. 5).

Statistische Unterschiede vor / nach Versuchsdurchführung und zwischen den Gruppen konnten – bis auf einzelne Versuchstiere - nicht festgestellt werden (Tabellen 24-27).

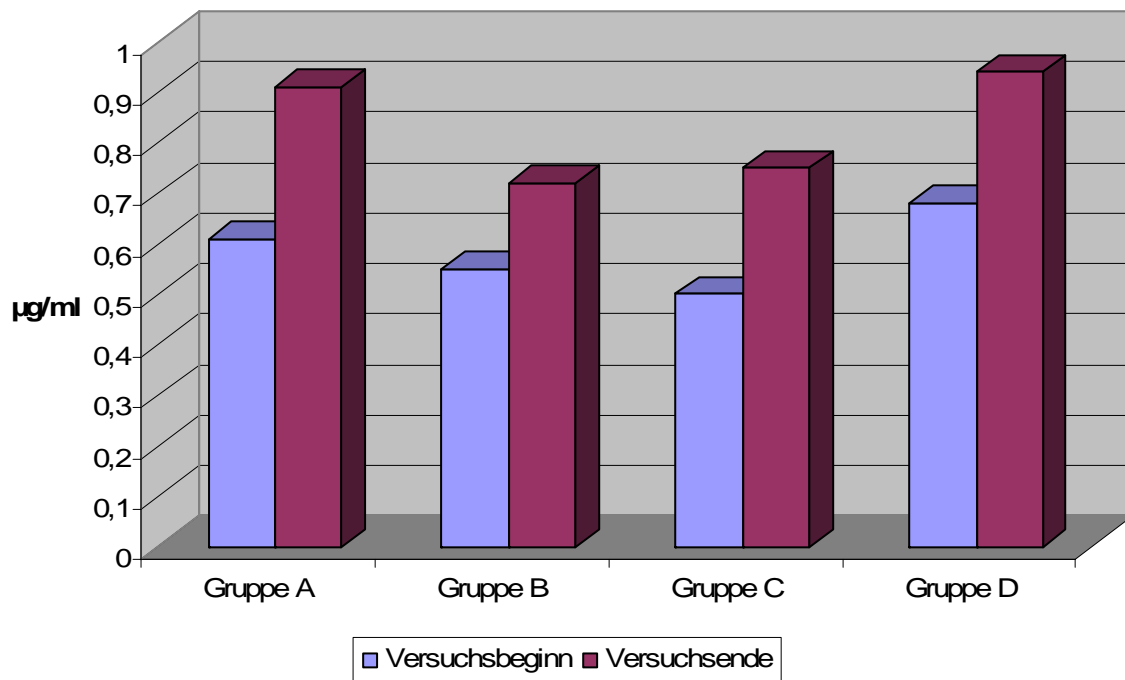


Abb. 5: Vergleich der MHK-Werte für *E. coli*-Isolate zu Versuchsbeginn (n = 10) und Versuchsende (n = 60)

Gruppe A: Fütterung mit Knochenmehl, unterschiedliche TC-Aufnahme

Gruppe B: Keine Behandlung

Gruppe C: Tägliche Applikation von 20,0 µg TC-Reinsubstanz

Gruppe D: Tägliche Applikation von 20,0 µg ATC-Reinsubstanz

Tab. 24: MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei *E. coli*-Isolaten vor und nach Knochenmehlfütterung / Gruppe A (Angaben in µg/ml)

	Etest® 0	Etest® 1	Etest® 2	Etest® 3	Etest® 4	Etest® 5	Etest® 6	Mittelwert	Varianz	MW-E0	Mittelwert-Offset der Kontrollgruppe	Varianz	Kritischer z-Wert bei einseitigem Test	z	Signifikante Erhöhung bzgl. =0,05
Gruppe A Knochenmehl	1	0,50	0,75	1,00	0,75	0,75	0,50	0,75	0,025	0,25	0,58	0,043	1,64	0,27	-
	2	0,09	1,01	0,75	0,75	0,75	1,00	0,84	0,017	0,74	0,66	0,035		2,04	■
	3	1,00	1,00	1,00	1,50	1,50	1,00	1,25	0,075	0,25	1,08	0,093		0,28	-
	4	0,75	1,00	0,75	0,75	0,75	1,00	0,83	0,017	0,08	0,66	0,034		0,31	-
	5	0,75	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00	0,88	0,019	0,13	0,70	0,036		0,16	-
	6	0,75	0,75	0,75	0,75	1,00	1,00	0,88	0,019	0,13	0,70	0,036		0,16	-
	7	0,50	0,75	0,75	1,00	1,00	0,75	0,83	0,017	0,33	0,66	0,034		0,58	-
	8	0,50	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	0,92	0,017	0,42	0,75	0,034		0,88	-
	9	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,010	0,46	0,79	0,028		1,03	-
	10	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,000	0,25	0,83	0,018		0,28	-
Mittelwert:	0,61						0,91					0,039			
Varianz:	0,06						0,04								

Tab. 25: MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei *E.coli*-Isolaten vor und nach oraler Applikation von TC-Reinsubstanz / Gruppe C (Angaben in µg/ml)

Gruppe C TC oral	0,55						0,75			0,03			MW-E0	Mittelwert -Offset der Kontrollgruppe	Varianz	Kritischer z-Wert bei einseitigem Test	z	Signifikante Erhöhung bzgl. =0,05				
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Mittelwert	Varianz										
1	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,50	0,75	0,75	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,25	0,58	0,018	-	-
2	0,50	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	0,96	0,010	0,46	0,79	0,028	1,071	-	-	
3	0,50	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,63	0,019	0,13	0,45	0,036	0,171	-	-	
4	0,50	0,50	0,75	0,50	0,75	0,75	0,50	0,50	0,50	1,00	0,75	0,75	0,75	0,71	0,035	0,21	0,54	0,053	0,14	-	-	
5	0,50	0,75	0,75	1,00	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00	0,83	0,83	0,017	0,33	0,66	0,034	0,606	-	-	
6	0,75	0,75	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,63	0,019	-0,13	0,45	0,036	1,103	-	-		
7	0,75	1,00	1,00	1,00	0,75	0,50	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83	0,042	0,08	0,66	0,059	0,326	-	-		
8	0,50	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00	0,83	0,83	0,83	0,017	0,33	0,66	0,034	0,606	-	-		
9	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,50	0,75	0,75	0,50	0,50	0,58	0,58	0,58	0,017	0,08	0,41	0,034	0,326	-	-		
10	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,71	0,71	0,71	0,010	0,21	0,54	0,028	0,14	-	-		

Tab. 26: MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei *E.coli*-Isolaten vor und nach oraler Applikation von ATC-Reinsubstanz / Gruppe D (Angaben in µg/ml)

	Etest® 0	Etest® 1	Etest® 2	Etest® 3	Etest® 4	Etest® 5	Etest® 6	Mittelwert	Varianz	MW-E0	Mittelwert-Offset der Kontrollgruppe	Varianz	Kritischer z-Wert bei einseitigem Test	z	Signifikante Erhöhung bzgl. =0,05
Gruppe D	11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,010	0,46	0,79	0,028	-	0,867	-
ATC oral	12	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	0,75	0,92	0,017	0,17	0,75	0,034	-	0,013	-
	13	1,00	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,67	0,017	-0,33	0,50	0,034	-	1,52	-
	14	0,50	0,75	0,75	0,75	1,00	1,00	0,83	0,017	0,33	0,66	0,034	-	0,49	-
	15	0,75	0,75	0,75	0,75	1,00	0,75	0,79	0,010	0,04	0,62	0,028	-	0,389	-
	16	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,000	0,50	0,83	0,018	-	0,992	-
	17	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,50	1,08	0,042	0,58	0,91	0,059	-	1,244	-
	18	0,50	1,00	1,50	1,50	1,00	1,00	1,25	0,075	0,75	1,08	0,093	-	1,746	■
	19	0,75	2,00	1,50	1,00	1,00	1,00	1,25	0,175	0,50	1,08	0,193	-	0,992	-
	20	0,75	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	0,79	0,010	0,04	0,62	0,028	-	0,389	-
Mittelwert:		0,65					0,95	0,95							0,055
Varianz:		0,03					0,07	0,07							

Tab. 27: MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei *E.coli*-Isolaten vor und nach Versuchsende der Kontrollgruppe B (keine Behandlung) (Angaben in µg/ml)

		Eitest® 0	Eitest® 1	Eitest® 2	Eitest® 3	Eitest® 4	Eitest® 5	Eitest® 6	Mittelwert	Varianz	MW-E0	Mittelwert -Offset der Kontrollgruppe	Varianz	Kritischer z-Wert bei einseitigem Test	n	Signifikante Erhöhung bzgl. =0,05
Gruppe B Kontrollgruppe	11	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,25					
	12	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,00					
	13	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,25					
	14	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,50	0,75	0,010	0,21					
	15	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,25					
	16	0,50	0,75	0,75	0,75	0,50	0,50	0,75	0,75	0,017	0,17					
	17	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,017	0,08					
	18	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,25					
	19	0,50	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,25					
	20	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,000	0,00					
Mittelwert:		0,55						0,72			0,17					
Varianz:		0,01						0,01			0,02					

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Versuchstiere (weibliche Crl: NMRI-Mäuse) mit tetracyclinhaltigem Knochenmehl gefüttert. Dieser Modellversuch diente der Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclin-Rückständen durch Rückstandsanalysen von Urin und verschiedenen Geweben. Bei Parallelgruppen wurden Tetracyclin- und Anhydrotetracyclin-Reinsubstanz-Lösungen in vergleichbaren Konzentrationen oral appliziert und ebenfalls Rückstandsanalysen durchgeführt.

Begleitet wurde dieser rückstandsanalytische Teil durch eine mikrobiologische Untersuchung von Kotproben gefütterter / behandelter Tiere, um festzustellen, ob diese Applikationen einen Einfluss auf die MHK-Werte für Tetracyclin bei aus dem Darminhalt isolierten *E. coli*-Isolaten hat.

Die angewendeten Methoden und die erhobenen Befunde sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Herstellung des Knochenmehls

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des Knochenmehls wurden ausschließlich Knochen von tauglich beurteilten, geschlachteten Mastschweinen verwendet. Die Knochen wurden in einem norddeutschen Zerlegebetrieb mittels UV-Auflicht bei einer Wellenlänge von 366 nm auf eine positive Fluoreszenz untersucht. Für die Knochenmehlherstellung wurden von diesen Knochen nur Knochensplitter verwendet, die eine deutlich positive Fluoreszenz aufwiesen. Der fluoreszenzoptische Nachweis stellt ein unkompliziertes und schnelles Screeningverfahren für Knochen auf gebundene Rückstände von Tetracyclinen mit einer Nachweisgrenze von 50 µg/kg dar (KÜHNE u. EBRECHT 1993).

Die Knochensplitter wurden für die Fütterung der Mäuse auf eine maximale Korngröße von 1 mm zermahlen. Dies war erforderlich, um eine vollständige Extraktion der gebundenen Wirkstoffe zu erreichen.

Der Tetracyclinegehalt des fein zermahlenden Knochenmehls wurde mittels HPLC-Untersuchung bestimmt.

5.1.2 Aufarbeitung des Knochenmehls für die HPLC-Untersuchung

Grundlage der Aufarbeitung des Knochenmehls für die HPLC-Untersuchung war die vorläufige amtliche Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen in Fleisch, Fisch, Milch, Ei und Honig nach § 35 LMBG (ANON. 2000). Die dort vorgeschriebene Extraktionsmethode mit Succinatpuffer eignet sich jedoch nicht für die Aufarbeitung von Knochenmaterial und musste entsprechend modifiziert werden. Für die Extraktion gebundener Tetracyclin-Rückstände in Knochen erwies sich der Einsatz von 1 M HCL als Extraktionsmittel mit nachfolgender Einstellung des pH-Wertes auf 4,0 als geeignet (KÖRNER 2000) und wurde auch in dieser Arbeit praktiziert. Es wurde eine zweitägige Extraktion zur Erfassung der Tetracyclin-Rückstände durchgeführt.

5.1.3 Haltung der Versuchstiere und Gewinnung des Probenmaterials

Die Mäuse wurden den tierschutzrechtlichen Anforderungen entsprechend gehalten. Aus diesem Grund wurden sie nach einem Versuchsintervall von 5 Tagen für die Dauer von 2 Tagen gruppenweise in Makrolonkäfigen gehalten. Während dieser Phase waren die Gewinnung des Probenmaterials und die Fütterung der Mäuse mit einer definierten Knochenmehlmenge nicht möglich. Während des 5-tägigen Versuchszeitraums wurden die Proben von jedem Tier einzeln gewonnen, die Probenmengen dokumentiert und unter geeigneten Bedingungen gelagert. Die Kotproben für die mikrobiologische Untersuchung wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C aufbewahrt, so dass die Darmbakterien nicht durch Kälteeinwirkung geschädigt werden konnten. Die Urinproben wurden bei - 18 °C bis zur Aufarbeitung gelagert.

5.1.4 Aufarbeitung der Urin-, Knochenmehl-, Oberschenkel- und Kotproben für die LC-ESI-MS-MS-Analyse

Für die Bestimmung der Tetracyclin-Konzentration in Urin, Knochenmehl, Oberschenkel und Kot wurde die analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen in Boden, Gülle und

Staub, die im Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover etabliert wurde, angewendet.

Zur Bestimmung des Blindwertes wurden unbelastete Mäuseurinproben nach dem Analysenprotokoll aufgearbeitet. Für die Bestimmung der Wiederfindung der Tetracycline im Mäuseurin wurden die Proben mit Tetracyclinen in methanolischer Lösung in definierter Konzentration versetzt, 10 min bei Umgebungstemperatur äquilibriert und entsprechend der Methode extrahiert sowie qualitativ und quantitativ analysiert. Die Zuverlässigkeit der Methode wurde durch Zusatz einer definierten Menge Tetracycline zum Mäuseurin getestet. Darüber hinaus wurden Matrixblindwerte mit rückstandsfreien Mäuseurinproben bestimmt, die zeigen sollten, dass zum Elutionszeitpunkt der Tetracycline kein Störpeak im Chromatogramm vorhanden war.

Diese Vorgehensweise wurde für die Analyse der Knochenmehl-, Oberschenkel- und Kotproben nicht praktiziert, da nur einige wenige Stichproben untersucht wurden.

5.1.5 Bestimmung der MHK-Werte für *E. coli*-Isolate

Die Bestimmung der MHK-Werte für *E. coli*-Isolate erfolgte mittels Etest® der Fa. AB BIODISK, Schweden. Hierbei handelt es sich um eine patentierte quantitative Technik zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration von aeroben und anaeroben Keimen. Der Test wird weltweit verwendet und ist in der Literatur in mehr als 3000 Publikationen beschrieben worden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Bestimmung der Tetracyclin-Gehalte im Knochenmehl

Nach Zerkleinerung der Knochensplitter auf eine maximale Partikelgröße von 1 mm erfolgte eine zweitägige Extraktion mit 1 M HCL zur vollständigen Erfassung der Tetracyclingehalte im Knochenmehl.

Die Tetracyclinegehalte nach dem 1. Extraktionstag betragen für OTC 320,6 µg/kg, für TC (TC + e-TC + ATC + e-ATC) 7666,1 µg/kg und für CTC (CTC + e-CTC + ACTC) 2843,6 µg/kg.

Nach dem 2. Extraktionstag konnten für OTC 523,3 µg/kg, für TC (TC + e-TC + ATC + e-ATC) 17574,8 µg/kg und für CTC (CTC + e-CTC + ACTC) 8523,0 µg/kg im Mittel nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Untersuchungen von KÜHNE et al. (2002), die bei Schlachttieren bis zu 50,0 mg/kg Tetracyclin im Knochen nachweisen konnten.

SCHULZE (2003) konnte zeigen, dass nach dem 3. Extraktionstag in fein zermahlene Knochen (Partikelgröße 1 - 2 mm) keine Rückstände von Tetracyclinen mehr nachweisbar waren. Aus diesem Grund wurde auf eine 3-tägige Extraktion verzichtet.

Da es sich bei den Rohstoffen für die Knochenmehl-Herstellung um gemischte Feldproben verschiedener Tiere handelte, war eine Belastung mit mehreren Tetracyclin-Derivaten nicht auszuschließen.

Das hier festgestellte ATC ist vermutlich durch die Säureentwicklung während der Extraktion entstanden.

5.2.2 Ermittlung der Tetracyclin-Konzentrationen in Urin, Oberschenkelknochen und Kot der Versuchstiere

Urin

Die mittleren Wiederfindungsraten in mittels LC-ESI-MS-MS analysierten Mäuseurinproben betragen für TC 101,8 % für CTC 117,0 % und für ATC 88,0 %. Hieraus kann geschlossen werden, dass die verwendete LC-ESI-MS-MS-Methode für die Untersuchung von Tetracyclin-Gehalten in Mäuseurin sehr verlässliche Ergebnisse liefert.

Die oral mit ATC behandelten Mäuse der Gruppe D wurden in den Versuchsaufbau aufgenommen, um einen direkten Vergleich mit den Mäusen der Gruppe A vornehmen zu können, falls diese nach der Fütterung mit Knochenmehl ATC im Urin ausgeschieden hätten. Dies war jedoch während der gesamten Versuchszeit bei keiner der 10 Mäuse der Gruppe A der Fall. Bei 4 Mäusen der Gruppe A konnten geringe CTC-Gehalte im Urin nachgewiesen werden, wobei es allerdings keine Vergleichsgruppe mit oraler CTC-Reinsubstanz-Applikation gab.

Die Mäuse der Gruppe B, die TC-freies Futter bekamen, wurden als Kontrollgruppe für die MHK-Wert-Bestimmung der *E.coli*-Isolate herangezogen.

Bei der Bewertung der nachgewiesenen Konzentrationen im Urin ist zu berücksichtigen, dass von den Versuchstieren während der behandlungsfreien Zeit keine Urinproben gesammelt und analysiert wurden.

Gruppe A

In der Gruppe A (mit TC-haltigem Knochenmehl gefütterte Tiere) konnten bei neun von zehn Mäusen Tetracyclinegehalte im Urin bereits nach einwöchiger Verfütterung nachgewiesen werden. Die starken individuellen Schwankungen der Urinkonzentrationen sind durch die unterschiedlich hohen aufgenommenen TC-Mengen und die individuellen Harnabsatzgewohnheiten zu erklären. Bei einer Maus konnte nicht genug Urin für eine Untersuchung aufgefangen werden. Auch CTC konnte bei vier Mäusen im Urin nachgewiesen werden. Dagegen wurde bei keiner Maus ATC im Urin festgestellt.

Hieraus folgt, dass an Knochen gebundenes TC und CTC während der Verdauungsprozesse - vermutlich unter maßgeblichem Einfluss der Magensäure während der Magenpassage - in lösliche Form gebracht, resorbiert und in den Blutkreislauf gelangt ist. Mit Tetracyclinen kontaminiertes Knochenmehl führt also bei oraler Applikation / Verfütterung zu einer sekundären Bioverfügbarkeit der Tetracycline.

Gruppe C

Auch in dieser Gruppe kam es durch individuelle Harnabsatzgewohnheiten zu großen Schwankungen in der TC-Ausscheidung im Urin. Hier konnten nur von 7 Versuchstieren Harnproben gewonnen werden.

Vergleich Gruppe A und C

Beim Vergleich der TC-Ausscheidung im Urin zwischen Gruppe A und C wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Die wöchentlich gemessene TC-Ausscheidung im Urin wurde

sowohl mit der pro Woche aufgenommenen TC-Menge als auch mit der insgesamt bis zu den Messzeitpunkten aufgenommenen TC-Menge für jede Maus einzeln in Beziehung gesetzt. Die Konzentrationen wurden hierfür durch die aufgenommenen Mengen TC dividiert und diese Werte dann gemittelt.

Durch dieses Vorgehen konnten trotz der unterschiedlich hohen aufgenommenen TC-Mengen (Gruppe A: Variabel durch unterschiedlich große Mengen aufgenommenes Knochenmehl; Gruppe C: 20 µg/Tag) die Gruppen A und C in ihren TC-Konzentrationen im Urin miteinander verglichen werden, da hier Quotienten - also Verhältnisse - gebildet wurden.

Eine Normierung der Gruppe A auf aufgenommene 20 µg/Tag wie bei Gruppe C ist zwar möglich. Allerdings müssten hierbei auch die Urinkonzentrationen in gleicher Weise normiert werden, was nur bei einer linearen Abhängigkeit von aufgenommener und im Urin ausgeschiedener TC-Menge zulässig wäre. Aufgrund der unterschiedlichen und bei der Maus nicht bekannten Proteinbindungen von TC im Körper wurde diese lineare Abhängigkeit nicht vorausgesetzt.

Beim oben beschriebenen Vergleich der Aufnahme- und Ausscheidungsmengen von TC zwischen den Gruppen A und C fällt auf, dass die ausgeschiedene TC-Menge in Gruppe C in Bezug auf die gleich bleibende oral aufgenommene TC-Menge in den drei Wochen um etwa das Dreifache ansteigt. Dies geschieht bei Gruppe A nicht. Dort bleiben die wöchentlich ausgeschiedenen TC-Mengen im Urin in Bezug zu den oral aufgenommenen variierenden TC-Mengen annähernd auf einem Level (siehe Abb. 4). Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) der Werte der Gruppen A und C zeigt hier einen signifikanten Unterschied sowohl bei Normierung auf die aufgenommene Wochenmenge TC als auch bei Normierung auf die aufgenommene Gesamtmenge TC in Woche 2 und Woche 3. Zu bemerken ist aber, dass die Ergebnisse der Woche 1 sich nicht signifikant unterscheiden. Also ist ein deutlicher Unterschied zwischen der oralen Aufnahme der Reinsubstanz TC und des an Knochenmehl gebundenen TC in der ersten Woche nicht vorhanden. Allein durch eine Kumulation bei Gabe der Reinsubstanz entsteht der signifikante Unterschied in der 2. und 3. Woche.

Offensichtlich reicht die in Gruppe C pro Woche aufgenommene Menge TC von 100 µg/kg im Vergleich zu der im Mittel pro Woche aufgenommenen TC-Menge von Gruppe A von 64,69 µg/kg aus, um bei den Mäusen der Gruppe C einen Ausscheidungskumulationseffekt zu erreichen. Allerdings liegt der Wert der Gruppe C nur um ein Drittel höher als der Wert der

Gruppe A. Es muss folgerichtig noch einen anderen Grund für das unterschiedliche Ausscheidungsverhalten der Mäuse der beiden Gruppen geben. Zum einen haben die Mäuse der Gruppe A an den Versuchstagen jeweils individuell unterschiedliche Mengen an TC mit dem Knochenmehl aufgenommen, so dass dem Körper keine gleich bleibenden Dosen an TC zugeführt wurden. Zum anderen war das aufgenommene TC bei Gruppe A an Knochen gebunden, so dass der Mäuseorganismus es erst aus den Chelatkomplexen lösen musste, was sicher eine Erschwerung und Verzögerung der Resorption nach sich zog. Darüber hinaus ist eine 100% ige Lösung des TC vom Knochen nicht zu erwarten.

Eine vorsichtige Kalkulation ergab einen Anteil von 30,3 % verglichen mit TC-Reinsubstanz.

Gruppe D und Vergleich mit den anderen Gruppen

Bei den Mäusen der Gruppe D, denen ATC oral appliziert wurde, wurden bei einer täglichen Aufnahme von 20 µg nur 0,08 % des aufgenommenen ATC im Urin ausgeschieden. Bei einer Applikation von 20 µg TC-Reinsubstanz in Gruppe C waren dies immerhin 1,32 % des oral applizierten TC und bei der Knochenmehlfütterung in Gruppe A 0,40 % des mit dem Knochenmehl aufgenommenen TC. Die Bioverfügbarkeit betrug 6,1 % verglichen mit Tetracyclin-Reinsubstanz.

Knochen

Der bevorzugte Einlagerungsort für Tetracycline im Körper sind nach Untersuchungen von BUYSKE et al. (1960) und STAHLMANN u. LODE (2001) die Mineralisierungszonen von knochenbildenden Geweben. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit von drei Tieren Knochenproben nach Versuchsende auf ihren TC-Gehalt hin untersucht. Diese drei Tiere zeigten während des Versuches in ihren Gruppen die jeweils höchsten TC- bzw. ATC-Ausscheidungen. Nur bei dem Tier der Gruppe C konnte TC im Knochen nachgewiesen werden. Die gespeicherte TC-Menge im Knochen der Maus der Gruppe C entsprach einem prozentualen Anteil von 0,19 % der applizierten TC-Menge. Das kann erklären, warum bei den Proben der Tiere von Gruppe A & D keine Tetracycline in den Knochen nachweisbar waren. Da die Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclinen und ATC deutlich geringer ist,

waren auch nur relativ geringe Konzentrationen in den Knochen zu erwarten, die hier mutmaßlich unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methode lagen.

Kot

Bei der Untersuchung des Kotes von Maus 10 aus Gruppe A konnte im Kot auch eine geringe Menge ATC nachgewiesen werden. Dieses ATC ist vermutlich in vivo im Magen unter Einwirkung von Salzsäure entstanden. Bei stark saurem pH-Wert kann es zur Dehydratation von TC kommen (MITSCHER 1978).

Bei Maus 12 aus Gruppe D wurde im Kot rechnerisch nur 5,6 % der insgesamt oral aufgenommenen Menge ATC nachgewiesen. Demgegenüber schied Maus 10 aus Gruppe C 51,7 % der insgesamt oral aufgenommenen TC-Menge mit dem Kot aus.

Da ATC kaum renal ausgeschieden wird und auch im abgesetzten Kot nur eine unbedeutende Menge nachgewiesen werden konnte, muss der Restgehalt an ATC noch im Körper verblieben sein. Aufgrund seiner nicht selektiven Wirkung auf Zellmembranen (MITSCHER 1978; SCHNAPPINGER u. HILLEN 1996) wäre nahe liegend, dass ATC in der Darmwand gespeichert sein könnte. Dies sollte in nachfolgenden Untersuchungen ermittelt werden.

5.2.3 Mikrobiologische Untersuchung zur Feststellung der MHK-Werte für Tetracyclin bei *Escherichia coli*-Isolaten aus Mäusekot

Für die Fragestellung einer eventuellen Resistenzinduktion bei Darmbakterien durch oral aufgenommene Tetracycline wurden die MHK-Werte für *E. coli*-Isolate der einzelnen Gruppen A, B, C und D verglichen.

Dabei zeigte sich, dass in allen vier Gruppen die MHK-Werte am Versuchsende geringfügig anstiegen. Allerdings lagen sowohl die MHK-Werte zu Versuchsbeginn als auch diejenigen am Versuchsende deutlich im sensiblen Bereich.

In der folgenden statistischen Auswertung war erkennbar, dass eine signifikante Erhöhung nur bei zwei Tieren auftrat und dadurch auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nicht gegeben war. Hiervon betroffen waren jeweils nur eine Maus aus Gruppe A (Knochenmehlfütterung) und eine Maus aus Gruppe D (Behandlung mit ATC-Reinsubstanz).

Beide Anstiege blieben jedoch deutlich im sensiblen Bereich. Laut Herstellerbeschreibung (Etest® der Fa. BIODISK Schweden, bezogen über VIVA Diagnostika, Diagnostische Produkte GmbH) wird ein MHK-Wert ab 16 µg/ml als intermediär und ein MHK-Wert ab 32 µg/ml als resistent bewertet. Die hier festgestellten MHK-Werte vor und nach Versuchsbeginn lagen alle unter oder bei 2 µg/ml.

Eine Erklärung für die in allen Gruppen geringfügig aufgetretene MHK-Wert-Erhöhung muss in einem systematischen Fehler, der alle Gruppen betraf, gesucht werden. Ansonsten ist eine MHK-Wert-Erhöhung bei der Kontrollgruppe B, die kein Tetracyclin bekommen hatte, nicht erklärbar.

Aus dem vorliegenden Datenmaterial kann bei einer fünfzehntägigen Fütterung von mit Tetracyclin belastetem Knochenmehl keine Resistenzinduktion bei *E.coli* im Darm der Maus anhand einer MHK-Veränderung nachgewiesen werden. Allerdings weist die signifikante Erhöhung des MHK-Wertes einer Maus aus Gruppe A auf die Möglichkeit hin, dass bei einer längeren Aufnahmedauer von belastetem Knochenmehl eine Resistenz entwickelt werden könnte. Um dies näher abzuklären, wären gegebenenfalls weitere, auch molekularbiologische Untersuchungen erforderlich.

5.3 Schlussfolgerungen

Im wissenschaftlichen Schrifttum wurde bislang angenommen, dass gebundene Tetracycline antimikrobiell inaktiv sind und, da Knochen für die menschliche Ernährung nicht verwendet werden, kein Risiko für den Verbraucher darstellen (WHO 1969; STAHLMANN u. LODE 2001). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass TC-haltige Knochenpartikel z.B. beim Verzehr von maschinell entbeintem Separatorenfleisch (MRM = Mechanical Recovered Meat) in die menschliche Nahrungskette gelangen können. Da es für Tetracyclin-Rückstände in Knochen bisher keine festgelegten Höchstmengen gibt, gelten betroffene Knochen als genusstaugliche Tierkörperanteile der Kategorie III.

In der vorliegenden Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass im Mäusemodell aus verfüttertem Knochenmehl gebundene Tetracycline im Magen-Darm-Trakt aus dem Knochen gelöst und somit sekundär bioverfügbar werden können. Hierbei liegt die Ausscheidungsrate von TC im Urin (Gruppe A mit Knochenmehlfütterung) in der ersten Versuchswoche nicht

deutlich unter der Ausscheidungsrate von mit TC-Reinsubstanz gefütterten Vergleichstieren (Gruppe C). Danach trat allerdings durch die orale Applikation der TC-Reinsubstanz an die Vergleichsgruppe ein Kumulationseffekt ein, der nach Knochenmehlverfütterung nicht zu beobachten war.

Die festgestellte sekundäre Bioverfügbarkeit von TC *in vivo* bestätigt die Untersuchungen von KÜHNE und KÖRNER (2001), die in einem In-vitro-Verdauungsversuch die Bioverfügbarkeit von gebundenen Chlortetracyclin-Rückständen untersuchten. Von den gefundenen Rückständen waren 51,6 % antimikrobiell aktiv. Dort wurde allerdings *in vitro* eine sekundäre Bioverfügbarkeit von über 50 % angenommen.

Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei einer Maus aus Gruppe A (Knochenmehlfütterung) und einer Maus aus Gruppe D (orale Applikation von ATC-Reinsubstanz) eine signifikante Erhöhung des MHK-Wertes bei *E. coli* im Mäusedarm nachgewiesen werden. Zu einer vollständigen Resistenzentwicklung kam es nicht.

Nach der Resorption können sich Tetracycline nach KROKER et al. (2002) durch ihre gute Lipophilie sehr gut im gesamten Körper verteilen.

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings in der Gruppe A (Knochenmehlfütterung) im nach Versuchsende untersuchten Oberschenkelknochen einer Maus kein eingelagertes TC festgestellt werden.

Weiter zu untersuchen ist der Verbleib von ATC, dass in der vorliegenden Untersuchung nur zu 0,08 % im Urin und zu 5,6 % mit dem Kot ausgeschieden wurde. Da ATC nephrotoxisch ist, nicht selektiv auf Zellwände wirkt und zur Zellauflösung führen kann, sowie im Magen aus TC durch Wasserabspaltung entstehen kann, sollte es in der Risikobewertung von TC-kontaminierten Schlachttierprodukten beachtet werden.

Gerade im Hinblick auf neue toxikologische Studien der JECFA, nach denen die MRLs für Tetracycline verdoppelt werden und der Sicherheitsfaktor von 10 zu streichen und stattdessen ein Gruppen-ADI-Wert von 0-30 µg/kg KGW festzusetzen ist (WHO 1999), sind weiterführende Untersuchungen von Bedeutung.

Noch ist dieser Empfehlung der WHO keine rechtliche Umsetzung gefolgt.

Außerdem ist bei einer möglichen Wiedezulassung der Verfütterung von Tiermehlen und Fleischknochenmehlen (KÜHNE u. MITZSCHERLING 2004) die Problematik der Aufnahme tetracyclinhaltiger Futtermittel zu berücksichtigen.

6 Zusammenfassung

Silke Mehlhose-Koch

Entwicklung eines Modells zur Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclin-Rückständen und Anhydrotetracyclin

Zur Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit von an Knochen gebundenen Tetracyclinen und mögliche Auswirkung auf die Sensibilität der Darmflora gegenüber Tetracyclinen wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Modell am Versuchstier entwickelt. Außerdem sollte die Bioverfügbarkeit von Anhydrotetracyclin untersucht werden. Über einen Zeitraum von drei Wochen wurden vierzig weibliche Crl: NMRI-Mäuse unter identischen Laborbedingungen in vier Gruppen mit unterschiedlichen oral zugeführten Substanzen gefüttert / behandelt.

Gruppe A erhielt ein mit Hackfleisch vermisches tetracyclinhaltiges Knochenmehl mit einem Gehalt von 17574,8 µg Tetracyclin (TC)/kg und einem Gehalt von 8523,0 µg Chlortetracyclin (CTC)/kg, das zu einer durchschnittlichen individuellen oralen Gesamt-Aufnahme von 64,69 µg TC und 31,35 µg CTC führte.

Gruppe B erhielt als Kontrollgruppe ein handelsübliches Fertigfutter.

Gruppe C erhielt täglich über 15 Tage 20 µg TC-Reinsubstanz oral appliziert.

Gruppe D erhielt täglich über 15 Tage 20 µg ATC-Reinsubstanz oral appliziert.

Kot und Urin der Mäuse wurden täglich gesammelt. Die Untersuchung der Urinproben auf die Tetracycline erfolgte wochen- und tierweise gepoolt mittels LC-ESI-MS-MS. Die MHK-Wert-Bestimmung von *E. coli*-Isolaten aus dem Mäusekot gegenüber TC erfolgte vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende mittels Etest®.

Weiterhin wurden von jeweils einem Tier der Gruppen A, C und D Oberschenkelknochenproben und Kotproben mittels LC-ESI-MS-MS auf ihren Tetracyclin-Gehalt untersucht.

Es konnte festgestellt werden, dass die im verfütterten Knochenmehl enthaltenen Tetracycline teilweise über den Urin ausgeschieden wurden. Damit wurde erstmals in vivo die sekundäre Bioverfügbarkeit Knochen-gebundener Tetracycline nachgewiesen. Verglichen mit der Gruppe, der TC-Reinsubstanz verabreicht wurde, betrug die Ausscheidung 30,3 %. In der ersten Untersuchungswoche zeigte sich jedoch zwischen den Gruppen A und C kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die TC-Konzentrationen im ausgeschiedenen Urin. In der mit ATC behandelten Gruppe konnten in Urin und Kot nur sehr geringe Mengen des Wirkstoffes nachgewiesen werden, was auf eine Retention im Körper hindeutet.

Tetracyclinablagerungen im Knochengewebe der gefütterten / behandelten Tiere konnten nur bei Gruppe C nachgewiesen werden.

Eine signifikante Änderung der MHK-Werte gegenüber TC bei aus dem Mäusekot gewonnenen *E. coli*-Isolaten konnte nicht nachgewiesen werden.

Die festgestellten Ergebnisse haben insbesondere für die Risikobewertung gebundener Tetracyclin-Rückstände in knochenhaltigen Lebens- und Futtermitteln Bedeutung.

7 Summary

Silke Mehlhose-Koch

Development of a model for the determination of the secondary bioavailability of bound tetracycline residues and anhydrotetracycline

To determine the secondary bioavailability of bound tetracycline residues in bone and possible consequences for the sensitivity of intestinal bacteria against tetracyclines a model using laboratory animals has been developed in the presented study.

For a period of three weeks forty female Crl: NMRI-mice in four groups living under identical laboratory conditions were fed / treated on altogether fifteen days with different orally supplied substances.

Group A was fed with minced meat mixed with bone meal with a content of 17574,8 µg tetracycline (TC)/kg and a content of 8523,0 µg chlortetracycline (CTC)/kg, which led to an average individual overall weekly uptake of 64,69 µg TC and 31,35 µg CTC.

Group B (control group) received a standard mice feed.

Group C was orally treated with 20 µg of pure tetracycline (TC) daily.

Group D was orally treated with 20 µg of pure anhydrocycline (ATC) daily.

Faeces and urine were collected every day. The examination of the urine samples for their TC content was done by pooling individual samples by week. The determination of MIC values-of *E. coli* isolates from mice faeces against TC was performed before and after the feeding / treatment period using Etest®.

Furthermore a femur bone sample and a faeces sample of one animal of group A, C and D were examined for their TC content using LC-ESI-MS-MS.

The results gave clear evidence that the orally administered bound tetracyclines were partly excreted via the urine. This was the first time that a secondary bioavailability of tetracyclines bound to bones has been shown in vivo. In comparison to the group which orally got pure

Summary

tetracycline the percentage of excretion was 30,3 %. In the first week of examination no significant difference between group A and C with respect to the TC concentrations could be seen in the excreted urine. In the group treated with ATC only very small amounts of the drug could be found in urine and faeces, which points to a retention in the body. TC residues in bone tissue of fed / treated animals could only be found in group C.

A significant change of the MIC values against TC *E. coli* isolates cultured from the mice faeces could not be proved.

The results of this study are of great significance particularly for the risk assessment of bound tetracycline residues in human food and animal feed containing bone.

8 Schrifttumsverzeichnis

AB BIODISK (2002):

Etest®

Predefined Gradient for MIC Determinations

Etest® is a registered trademark of AB BIODISK and is patented in all major markets.

ADAM, D. und W. CHRIST (1993):

Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Forth, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE (1993) (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie.

Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, S. 651-655

ANHALT, G. (1980):

Maschinelle Fleisch-Knochen-Separation. Technologie und Anforderungen. Arch. Lebensmittelhyg. 31, 12-16

ANONYM (2000):

Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und deren Epimeren, Doxycyclin und Demeclocyclin in Fleisch, Fisch, Milch, Ei und Honig. Vorläufige prävalidierte HPLC-Methode nach § 35 LMBG (jetzt: § 64 LFGB).

Beuth Verlag, Berlin, L 06.00 48

AYRES, J. C., H. W. WALKER, M. J. FANELLI, A. W. KING, F. THOMAS (1956):

Use of antibiotics in prolonging storage life of dressed chicken.

Food Technol. 10, 563-568

BERTRAND, K. P., K. POSTLE, L. V. WRAY u. W. S. REZNIKOFF (1984):

Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant.

J. Bacteriol. 158, 910-919

BETTE, P. (1996):

Prüfung und Bewertung der Unbedenklichkeit von Tierarzneimitteln.

in: FREY, H.-H., u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

1. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 681-696

BLACKWOOD, R. K. (1985)

Structure Determination and Total Synthesis of the Tetracyclines. In: Hlavka, J. J., BOOTHE, J. H. (Eds.) (1985): Handbook of the Experimental Pharmacology, Vol. 78, The Tetracyclines.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, S. 59-136

BLOMQUIST, L., u. A. HANNGREN (1966):

Fluorescence technique applied to whole body sections for distribution studies of tetracyclines.

Biochem. Pharmacol. 15, 215-219

BRAUDE, R. (1978):

Antibiotics in animal feed in Great Britain.

J. Anim Sci. 46, 1425-1436

BRÜGGEMANN, J., U. LÖSCH, M. MERKENSCHLAGER u. I. OFFTERDINGER (1966):

Ablagerung von Tetracyclin im Knochengewebe von Tieren bei dem Zusatz von Tetracyclin zum Futter.

Zbl. Vet. A. 13, 59-74

BURDETT, V. (1986):

Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent.

J. Bacteriol. 178, 3246-3251

BUYSKE, D. A., H. J. EISNER u. R. G. KELLY (1960):

Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 130, 150-156

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT
(BVL) (2003):

Nationaler Rückstandskontrollplan 2000 und 2001. Ergebnisse der amtlichen Rückstandsuntersuchungen der Länder. Zusammenfassung Deutschland.

[Internet: URL: <http://www.bvl.bund.de>]

BVL (Hrsg.) (2003):

Resistenzmonitoring ausgewählter pathogener Bakterien von erkrankten lebensmittelliefernden Tieren.

Publikation in Vorbereitung

CHOPRA, I. (1985):

Mode of action of the tetracyclines and the nature of bacterial resistance to them.

In: Hlavka, J. J., BOOTHE, J. H. (Eds.) (1985): Handbook of the Experimental Pharmacology, Vol. 78, The Tetracyclines.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, S. 317-392

CHOPRA, I., P. M. HAWKEY u. M. HINTON (1992):

Tetracyclines, molecular und clinical aspects.

J. Antimicrob. Chemother. 29, 245-277

CHOPRA, I. u. M. ROBERTS (2001) :

Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 232-260

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY (1999):

Opinion of the scientific steering committee on antimicrobial resistance. Directorate General XXIV, directorate B, unit B3, 29th May 1999, 93-117.

[Internet: URL: <http://europa.eu.int/comm./dg24>]

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY (2000):

Commission Decision of 29th June 2000 regulating the use of material presenting risks as regards transmissible spongiform encephalopathies and amending Decision 94/474/EC. Off. J. EEC L 158, 76-82

COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITY (2000):

Council Decision (2000/766/EC) of 4th December 2000 concerning certain protective measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal proteins. Off. J. EEC L 306, 32-33.

CVMP (COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS) (1996):

Doxycycline Hyclate, Summary Report

in: EMEA (Hrsg.)/MRL/101/96-FINAL

[Internet: <http://www.eudra.org>]

DÄMMRICH, K. (1969):

Die Eigenfluoreszenz der Tetracycline und ihre Anwendung bei der Untersuchung des Skeletts.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 16, 309-311

DEGENKOLB, J., M. TAKAHASHI, G. A. ELLESTAD u. W. HILLEN (1991):

Structural requirements of tetracycline-tet repressor interaction: Determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the tet repressor.

Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1591-1595

EGMOND, H.J.van, J.F.M. NOUWS, R. SCHILT, W.D.M. van LANKVELD- DRIESSEN, E.P.M. STREUTJENS-van NEER u. F.G.H. SIMONS (2000):

Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process.

In: GINKEL, L. A. van & A. RUITER (Hrsg.): Proceedings of EuroResidue IV conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, 8-10 May 2000

University of Utrecht, 430-437

FEDESA (European Federation of Animal Health) (1998):

Pressemitteilung vom 6. September 1998.

zitiert in: Dtsch. Tierärztebl. 11, 1093

FEDESA (European Federation of Animal Health) (2001):

Pressemitteilung vom 13. Juni 2001.

[Internet: <http://www.FEDESA.be/Pressroom/PR-130601.htm>]

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) (1972):

Antibiotics in animal feeds. Report to the Commissioner of the food and Drug Administration by the FDA Task Force. Available upon request to Bureau of Veterinary Medicine, FDA, 5600 Fishers Lane, Rockville, MD 20852

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Department of health and human services (1996):

Tolerances of residues of new animal drugs in food.

Subpart B: Specific tolerances for residues of new animal drugs.

GEMMER, H., H. SEEGER u. W. SCHALE (1973):

Beurteilung von Tetracyclin-Rückständen in Knochen von Schlachttieren.

Fleischwirtsch. 53, 1598-1599

GRÄFE, U. (1992):

Biochemie der Antibiotika.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 324-327

GUINEY, D. G. Jr., P. HASEGAWA u. C. E. DAVIS (1984):

Expression of Escherichia coli of cryptic tetracycline resistance genes from Bacteroides R plasmids.

Plasmid 11, 248-252

HEITZMAN, R. J. (Hrsg.) (1994):

Veterinary Drug Residues.

Blackwell Scientific Publications, Oxford, S. 5/1

HALLING-SØRENSEN, B., G. SENDELØV, J. TJØRNELUND (2002):

Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42, 263-271

HLAVKA, J. J., u. J. H. BOOTHE (Hrsg.) (1985):

The Tetracyclines.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-3

(Handb. Exp. Pharm. 78)

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA) (1998):

Assessment of the effects of antimicrobial drug residues in food on the human intestinal microflora.

In: Evaluation of certain veterinary drug residues in food,

Forty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,

Geneva 1998 (WHO Technical Report Series, No. 876), S. 2-5, 71-83

KAUFMANN, A., B. PACCIARELLI, A. PRIJIC, B. RYSER u. S. ROTH (1999):

Bestimmung von Rückständen von Tetracyclinen in Lebensmitteln.

Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 167-176

KLEBINGER, W. (1992):

Aktivitätsverluste von Chemotherapeutika (Tetracycline und Sulfonamide) bei der Brühwurstherstellung.

Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Gärungstechnologie, Diss.

KLIMOVA, N. E., u. O. B. ERMOLOVA (1976):

Embryotoxicity and the immunodepressive action of tetracycline and its epi- and anhydroderivatives. Antibiotiki 21, 1018-1022

KÖRNER, U. (2000):

Tetracyclin-Rückstände in Tiermehlen und Fleischknochenmehlen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

KROKER, R., R. SCHERKL u. F. R. UNGEMACH (2002):

Chemotherapie bakterieller Infektionen.

in: H.-H. FREY u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

2. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 353-389

KÜHNE, M. (1995):

Rückstände von Tetracyclin-Metaboliten - Nachweis und Bedeutung.

in: 36. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Dtsch. Veterinärmed. Ges., Teil II, Garmisch-Partenkirchen, 1995, 179-185

KÜHNE, M., u. A. EBRECHT (1993):

The detection of fluorescence in bones - a suitable screening for tetracyclines.

in: N. HAAGSMA, A. RUITER u. P. B. CZEDIK-EYSENBERG (Hrsg.): Proceedings of the EuroResidue II conference, Veldhoven, The Netherlands, 429-432

KÜHNE, M., G. HAMSCHER, U. KÖRNER, D. SCHEDL u. S. WENZEL (2001a):
Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal derived feed containing tetracycline.

Food Chemistry 75, 29-35

KÜHNE, M. u. U. KÖRNER (2001b):

Bound chlortetracycline residues in bones: release under acidic conditions.

Food Chemistry 72, 41-44

KÜHNE, M., S. WEGMANN, A. KOBE u. R. FRIES (2000):

Tetracycline residues in bones of slaughtered animals.

Food Control 11, 175-180

KÜHNE, M. u. S. WENZEL (2001c):

4-epi chlortetracycline residues in muscle.

Arch. Lebensmittelhyg. 52, 40-42

KÜHNE, M. u. A. T. MITZSCHERLING (2004)

Zum Eintrag von gebundenen Tetracyclin-Rückständen in die Nahrungskette- Ein Beitrag zur Gefahrenidentifikation

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, 201-206

LEVY, S. B. (1992)

The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle

Plenum Press, New York, S. 1-279

MILCH, R. A., D. P. RALL u. J. E. TOBIC (1957):

Bone localisation of tetracyclines.

J. Nat. Can. Inst. 19, 87-91

MITSCHER, L. A. (1978):

The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics.

Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, S. 4-6, 123-125

(Medicinal Research Series Vol. 9)

MOSHER, H. R. und L. C. VINING (1992):

Antibiotic Resistance.

In: J. Lederberg (Ed.): Encyclopedia of Microbiology, Vol. 1.

Academic Press Inc., San Diego, New York, S. 97-106

MOYED, H. S., T. T. NGUYEN, K. P. BERTRAND (1983):

Multicopy Tn 10 tet plasmids confer sensitivity to induction of tet gene expression. J.

Bacteriol. 155, 549-556

OKA, H., Y. ITO u. H. MATSUMOTO (2000):

Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods.

J. Chromatogr. A 882, 109-133

OLIVA, B., G. GORDON, P. McNICHOLAS, G. ELLESTAD u. I. CHOPRA (1992):

Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Escherichia coli.

J. Antimicrob. Chemother. 36, 913-919

OTTEN, H., M. PLEMPPEL u. W. SIEGENTHALER (Hrsg.) (1975):

Antibiotika-Fibel.

4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 325

ROGALSKI, W. (1985):

Chemical modification of the tetracyclines.

in: J. J. HLAVKA u. J. H. BOOTHE (Hrsg.): The Tetracyclines.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 179-326 (Handb. Exp. Pharm. 78)

ROSE, M. D., J. BYGRAVE, W. H. H. FARRINGTON u. G. SHEARER (1996):

The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxytetracycline.

Food Addit. Contam. 13, 275-286

SCHEDL, D. (2000):

Ein Beitrag zur Risikobewertung von Tetracyclin-Rückständen in Lebensmitteln: Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin gegenüber humaner Darmflora und zur Resistenzinduktion bei *E. coli* durch Anhydrotetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHNAPPINGER, D., u. W. HILLEN (1996):

Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms.

Arch. Microbiol. 165, 359-369

SCHULZE, F. (2003):

Verbleib in Knochen gebundener Rückstände von Tetracyclinen während der Herstellung von Gelatine mit dem sauren Aufschlussverfahren.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SMIT, L.A., N. HAAGSMA und A. RUITER (1999):

Bound sulphadimidine residues in raw fermented sausage: release under acidic conditions and bioavailability in rats.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 208, 183-188

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

Antibiotika und Chemotherapeutika.

in: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN u. K. STARKE (Hrsg.):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

8. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 837-841

SWANN, M. (1969):

Joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine: Report presented to Parliament. Her Majesty's Stationary Office, London.

THANASSI, D. G., G. S. SUH u. H. NIKAIDO (1995):

Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 177, 998-1007

TARR; h. L. a., B: a. SOUTHCOTT, H. M. BISSETT (1952):

Experimental preservation of flesh food with antibiotics. Food Technol. 6. 363-366.

TROLLDENIER, H. (1999):

Antimikrobielle Tierarzneimittel: Resistenzentwicklung und Monitoring.

In: 23. Kongr. d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Bad Nauheim, 1999, Ber., 3-17

VARNAM, A. H., u. J. P. SUTHERLAND (1995):

Meat and meat products – technology, chemistry and microbiology.

Verlag Chapman & Hall, London, 126

WALTER, M. und L. HEILMEYER (1969):

Antibiotika Fibel.

3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

WALTON, V. C., M. R. HOWLETT u. G. B. SELZER (1970):

Anhydrotetracycline and 4-epianhydrotetracycline in market tetracyclines and aged tetracycline products.

J. Pharm. Sci. 59, 1160-1164

WEIDENBERG, E. (2002):

Vergleich verschiedener Aufschlussverfahren zur Herstellung von Gelatine aus Knochen im Hinblick auf Rückstände von Tetracyclinen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

WHO (World Health Organisation) (1990):

Evaluation of certain veterinary drugs residues in food.

36th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No 799; WHO Geneva, 17-18, 41-44

WHO (World Health Organisation) (1996):

Evaluation of certain veterinary drugs residues in food.

45th report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 32-40

WHO (World Health Organisation) (1998):

Evaluation of certain veterinary drugs residues in food.

47th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 22-24

WHO (World Health Organisation) (1999):

Evaluation of certain veterinary drugs residues in food.

50th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 50-54

WIESNER, E. und R. RIBBECK (1991):

Wörterbuch der Veterinärmedizin A-K.

3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, S. 356

ZURHELLE, G., M. PETZ, E. MÜLLER-SEITZ u. E. SIEWERT (1999):

Tetracyclines and their metabolites in egg white and yolk.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. A 108, 299-300

Gesetze und Verordnungen

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90

des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs.

Amtsbl. der EG Nr. L 224/1

Richtlinie 81/852/EWG:

"Rückstände sind alle wirksamen Bestandteile oder deren Metabolite, die im Fleisch oder anderen Lebensmitteln enthalten sind, die von Tieren gewonnen wurden, denen das betreffende Arzneimittel verabreicht wurde."

1999/534/EG

Entscheidung des Rates vom 19. Juli 1999 über Maßnahmen zum Schutz gegen die transmissiblen spongiformen Encephalopathien bei der Verarbeitung bestimmter tierischer Abfälle und zur Änderung der Entscheidung 97/753/EG der Kommission.

Amtsbl. der EG Nr. L 204/37-42

Entscheidung 1999/724/EG

der Kommission vom 28. Oktober 1999 zur Änderung des Anhangs II der Richtlinie 92/118/EWG des Rates über die tierseuchenrechtlichen und gesundheitlichen Bedingungen für den Handel mit Erzeugnissen tierischen Ursprungs in der Gemeinschaft sowie für ihre Einfuhr in die Gemeinschaft, soweit sie diesbezüglich nicht den spezifischen Gemeinschaftsregelungen nach Anhang A Kapitel I der Richtlinie 89/662/EWG und - in bezug auf Krankheitserreger - der Richtlinie 90/425/EWG unterliegen.

Amtsbl. der EG Nr. L 290/32

Entscheidung 2000/20/EG

Der Kommission vom 10. Dezember 1999 über Genusstauglichkeitsbescheinigungen für die Einfuhr aus Drittländern von Speisegelatine und von Rohwaren zur Herstellung von Speisegelatine.

Amtsbl. der EG Nr. L 6/60

Gesetz

über den Verkehr mit Lebensmitteln, Futtermitteln, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) vom 01. September 2005.

Bundesgesetzblatt Jahrgang 2005 Teil I, Nr. 55, S. 2618

9 Anhang

9.1 Übersicht über die Wiederfindungsraten von Tetracyclinen in Knochen:

Tab. I: Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Tetracyclinen aus Knochen
(nach SCHULZE 2003)

Tetracyclin	Probe	dotierte	wiedergefundene Menge	Wiederfindungsrate
OTC	1	5	3.22	64.4
	2	5	3.35	67.0
	3	5	3.09	61.7
	4	5	3.57	71.4
	Mittelwert	5	3.31	66.1
TC	1	5	3.50	69.9
	2	5	3.27	65.4
	3	5	3.18	63.6
	4	5	3.16	63.2
	Mittelwert	5	3.28	65.5
E-TC	1	5	2.93	58.6
	2	5	3.04	60.8
	3	5	3.05	61.1
	4	5	3.00	60.0
	Mittelwert	5	3.01	60.1
ATC	1	5	2.38	47.5
	2	5	2.25	44.9
	3	5	2.24	44.7
	4	5	2.33	46.7
	Mittelwert	5	2.30	46.0
E-ATC	1	5	2.39	47.7
	2	5	2.08	41.6
	3	5	2.12	42.5
	4	5	2.17	43.3
	Mittelwert	5	2.19	43.8
CTC	1	10	5.06	50.6
	2	10	5.86	58.6
	3	10	4.93	49.3
	4	10	6.68	66.8
	Mittelwert	10	5.63	56.3
E-CTC	1	10	4.75	47.5
	2	10	4.98	49.8
	3	10	5.06	50.6
	4	10	4.69	46.9
	Mittelwert	10	4.87	48.7

9.2 Gewonnene Proben (oral aufgenommene Knochenmehl-Mengen sowie Urin- und Kotmengen in g), Tabellen II-IV

Tab. II: Übersicht über die aufgenommenen Knochen-, TC und CTC-Mengen in μg durch die Mäuse der Gruppe A, sowie der gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g

Tab. III: Übersicht über die gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g der Mäuse der Gruppe C (orale Behandlung mit TC-Reinsubstanz)

Tab. IV: Übersicht über die gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g der Mäuse der Gruppe D (orale Behandlung mit ATC-Reinsubstanz)

Tab. II: Übersicht über die aufgenommenen Knochen-, TC und CTC-Mengen in μg durch die Mäuse der Gruppe A, sowie der gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g

Mäuse Gr. A	Tägl. gefressene Knochenmenge pro Maus	Aufgen. Menge TC pro Wo. in μg bei 17,58 μg TC pro g Knochenmehl	Aufgen. Menge CTC pro Wo. in μg bei 8,52 μg CTC pro g Knochenmehl	Aufgen. Menge TC + CTC pro Wo. in μg bei 26,1 μg TC + CTC pro g Knochenmehl	Urinmenge in g	Kotmenge in g
Maus 1 A						
21.06.2004	0,32				0,71	0,09
22.06.2004	0,30				0,09	0,16
23.06.2004	0,25				0,51	0,72
24.06.2004	0,21				1,04	0,95
25.06.2004	0,29				0,18	0,58
		24,65	11,95	36,60		

Anhang

28.06.2004	0,21				0,83	2,03
29.06.2004	0,26				0,36	0,81
30.06.2004	0,18				0,69	1,00
01.07.2004	1,00				0,55	0,92
02.07.2004	0,74				0,53	2,36
		42,29	20,50	63,13		
05.07.2004	0,68				0,57	1,94
06.07.2004	0,91				0,82	1,31
07.07.2004	0,87				0,52	3,46
08.07.2004	0,71				0,22	2,43
09.07.2004	0,52				0,18	2,10
		65,00	31,50	96,73		
Mittelwert d. 3 Wo.		43,98	21,31	65,49		
Maus 2 A						
21.06.2004	0,45				1,53	0,39
22.06.2004	0,89				1,08	0,22
23.06.2004	0,99				0,80	1,17
24.06.2004	0,98				2,02	2,21
25.06.2004	0,98				1,59	1,41
		76,11	36,89	113,22		
28.06.2004	0,27				1,09	2,37
29.06.2004	0,94				1,41	0,69
30.06.2004	0,91				2,49	2,07
01.07.2004	0,99				2,93	1,83
02.07.2004	0,96				1,63	2,33
		72,23	35,00	107,48		
05.07.2004	0,93				2,67	2,13
06.07.2004	0,98				1,51	2,18
07.07.2004	1,00				2,28	3,07
08.07.2004	0,69				0,40	2,91
09.07.2004	0,55				0,53	2,03
		73,10	35,42	108,73		
Mittelwert d. 3 Wo.		73,81	35,77	109,81		
Maus 3 A						
21.06.2004	0,30				3,79	0,00
22.06.2004	0,35				1,49	0,07
23.06.2004	0,21				2,78	1,59
24.06.2004	0,20				2,68	0,83
25.06.2004	0,45				2,54	1,03
		27,91	13,53	41,80		

Anhang

28.06.2004	0,78				0,82	1,72
29.06.2004	0,93				1,89	1,25
30.06.2004	0,83				1,65	1,77
01.07.2004	0,99				1,52	1,60
02.07.2004	1,00				0,93	2,27
		80,61	39,07	119,87		
05.07.2004	0,99				0,78	1,85
06.07.2004	0,99				2,12	1,77
07.07.2004	0,58				1,71	2,82
08.07.2004	1,00				1,62	1,87
09.07.2004	0,85				0,67	2,16
		77,53	37,57	115,32		
Mittelwert d. 3 Wo.		62,02	30,06	92,33		
Maus 4 A						
21.06.2004	0,30				1,61	0,38
22.06.2004	0,29				0,73	0,17
23.06.2004	0,81				0,80	0,97
24.06.2004	0,62				1,21	1,32
25.06.2004	0,94				0,86	0,76
		53,02	25,70	79,01		
28.06.2004	0,91				0,73	2,30
29.06.2004	0,60				0,34	1,63
30.06.2004	0,93				0,50	1,69
01.07.2004	0,98				0,94	2,00
02.07.2004	0,98				1,04	2,57
		77,79	37,70	115,71		
05.07.2004	0,97				1,08	2,08
06.07.2004	0,98				0,81	1,72
07.07.2004	0,71				0,32	2,85
08.07.2004	0,95				1,34	2,59
09.07.2004	0,69				0,37	1,91
		76,09	36,88	113,18		
Mittelwert d. 3 Wo.		68,97	33,43	102,63		
Maus 5 A						
21.06.2004	0,95				1,99	0,11
22.06.2004	0,58				1,33	0,85
23.06.2004	0,63				0,78	0,84
24.06.2004	0,93				1,20	1,27
25.06.2004	0,84				1,05	1,14
		69,75	33,80	103,78		

Anhang

28.06.2004	0,45				1,02	2,31
29.06.2004	0,38				0,95	0,96
30.06.2004	0,62				0,82	0,89
01.07.2004	0,47				0,85	1,11
02.07.2004	0,86				0,92	1,48
		49,45	23,96	73,70		
05.07.2004	0,61				0,60	1,57
06.07.2004	0,68				0,55	1,35
07.07.2004	0,86				0,75	1,85
08.07.2004	0,44				0,60	1,36
09.07.2004	0,31				0,16	1,11
		51,36	24,89	76,54		
Mittelwert d. 3 Wo.		56,85	27,55	84,67		
Maus 6 A						
21.06.2004	0,51				2,75	0,00
22.06.2004	0,96				0,73	0,36
23.06.2004	0,92				0,46	1,37
24.06.2004	0,90				1,74	2,04
25.06.2004	0,91				0,88	1,43
		75,06	36,38	111,65		
28.06.2004	0,74				0,97	2,22
29.06.2004	0,57				0,56	1,02
30.06.2004	0,76				0,59	1,28
01.07.2004	0,53				0,30	1,39
02.07.2004	0,57				0,61	1,61
		55,80	27,04	83,10		
05.07.2004	0,42				0,36	1,34
06.07.2004	0,55				0,77	0,70
07.07.2004	0,50				1,04	2,69
08.07.2004	0,42				1,18	1,85
09.07.2004	0,37				0,14	0,89
		40,35	19,55	60,21		
Mittelwert d. 3 Wo.		57,07	27,66	84,99		
Maus 7 A						
21.06.2004	0,32				0,85	0,20
22.06.2004	0,88				0,81	0,19
23.06.2004	0,98				1,19	1,33
24.06.2004	1,00				0,41	2,13
25.06.2004	1,00				0,06	1,82
		73,97	35,85	110,06		

Anhang

28.06.2004	0,73				0,28	2,96
29.06.2004	0,97				0,40	1,23
30.06.2004	0,98				0,06	1,70
01.07.2004	0,98				0,19	1,67
02.07.2004	0,98				0,07	2,07
		81,86	39,67	121,74		
05.07.2004	1,00				1,12	1,89
06.07.2004	0,97				0,02	1,60
07.07.2004	0,82				0,00	2,56
08.07.2004	1,00				0,29	2,17
09.07.2004	0,73				0,04	2,12
		79,57	38,56	118,32		
Mittelwert d. 3 Wo.		78,47	38,03	116,71		
Maus 8 A						
21.06.2004	0,67				1,04	0,00
22.06.2004	0,82				0,25	0,53
23.06.2004	0,80				0,00	1,57
24.06.2004	0,44				0,53	1,89
25.06.2004	0,97				0,39	1,29
		66,14	32,05	98,43		
28.06.2004	0,92				0,28	3,17
29.06.2004	0,69				0,20	1,54
30.06.2004	0,70				0,11	1,24
01.07.2004	0,71				0,07	1,72
02.07.2004	0,69				0,00	1,74
		65,60	31,79	97,62		
05.07.2004	0,67				0,01	1,41
06.07.2004	0,64				0,21	0,80
07.07.2004	0,49				0,00	2,38
08.07.2004	0,75				0,00	1,67
09.07.2004	0,69				0,24	2,19
		57,70	27,96	85,91		
Mittelwert d. 3 Wo.		63,14	30,60	93,99		
Maus 9 A						
21.06.2004	0,98				1,87	0,52
22.06.2004	0,83				1,60	1,63
23.06.2004	0,65				0,30	1,47
24.06.2004	0,68				0,75	1,95
25.06.2004	1,00				0,42	0,85

Anhang

		73,42	35,58	109,21		
28.06.2004	0,99				0,00	3,14
29.06.2004	0,87				0,05	1,41
30.06.2004	0,95				0,05	1,55
01.07.2004	0,98				0,05	1,80
02.07.2004	0,67				0,00	1,97
		79,21	38,39	117,80		
05.07.2004	1,00				0,23	1,50
06.07.2004	1,00				0,12	1,69
07.07.2004	0,94				0,07	2,03
08.07.2004	1,00				0,34	1,88
09.07.2004	0,80				0,01	1,76
		83,57	40,50	124,25		
Mittelwert d. 3 Wo.		78,73	38,16	117,09		
Maus 10 A						
21.06.2004	0,99				2,31	0,10
22.06.2004	0,47				1,42	1,37
23.06.2004	0,60				1,34	1,02
24.06.2004	0,85				1,57	1,33
25.06.2004	0,93				1,46	1,17
		68,26	33,08	101,57		
28.06.2004	0,81				1,41	2,40
29.06.2004	0,77				1,05	1,07
30.06.2004	0,81				0,92	1,54
01.07.2004	0,94				2,04	1,36
02.07.2004	0,49				1,21	1,97
		67,38	32,66	100,27		
05.07.2004	0,79				1,19	1,08
06.07.2004	0,57				1,32	1,18
07.07.2004	0,62				1,36	1,92
08.07.2004	0,73				1,39	1,46
09.07.2004	0,46				0,68	0,88
		56,03	27,15	83,44		
Mittelwert d. 3 Wo.		63,89	30,96	95,09		
Mittelwert von allen Mittelwerten der 3 Wochen		64,69	31,35	96,28		

Tab. III: Übersicht über die gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g der Mäuse der Gruppe C (orale Behandlung mit TC-Reinsubstanz)

Mäuse-Gruppe C (Tetracyclin orale Applikation)			
Maus 1 C	TC-Reinsubst. in µg	Urinmenge in g	Kotmenge in g
19.07.2004	20,0	1,89	0,31
20.07.2004	20,0	1,23	1,19
21.07.2004	20,0	2,16	1,58
22.07.2004	20,0	1,94	1,41
23.07.2004	20,0	1,89	1,42
26.07.2004	20,0	1,56	1,46
27.07.2004	20,0	0,80	0,72
28.07.2004	20,0	1,30	0,88
29.07.2004	20,0	1,01	1,18
30.07.2004	20,0	0,53	1,16
02.08.2004	20,0	0,78	1,02
03.08.2004	20,0	0,80	0,71
04.08.2004	20,0	1,05	1,04
05.08.2004	20,0	0,75	1,03
06.08.2004	20,0	1,24	0,00
Maus 2 C			
19.07.2004	20,0	0,17	0,73
20.07.2004	20,0	0,54	2,05
21.07.2004	20,0	0,16	0,94
22.07.2004	20,0	0,09	1,09
23.07.2004	20,0	0,09	1,74
26.07.2004	20,0	0,16	1,95
27.07.2004	20,0	0,47	2,08
28.07.2004	20,0	0,39	1,60
29.07.2004	20,0	0,59	2,04
30.07.2004	20,0	0,48	2,65

Anhang

02.08.2004	20,0	0,21	1,58
03.08.2004	20,0	0,09	1,07
04.08.2004	20,0	0,09	1,09
05.08.2004	20,0	0,08	0,98
06.08.2004	20,0	0,27	0,12
Maus 3 C			
19.07.2004	20,0	0,21	0,00
20.07.2004	20,0	0,02	1,49
21.07.2004	20,0	0,28	1,37
22.07.2004	20,0	0,27	1,65
23.07.2004	20,0	0,88	1,53
26.07.2004	20,0	0,12	1,24
27.07.2004	20,0	0,31	1,25
28.07.2004	20,0	0,51	1,46
29.07.2004	20,0	0,44	1,36
30.07.2004	20,0	0,37	1,87
02.08.2004	20,0	0,30	2,27
03.08.2004	20,0	0,20	1,56
04.08.2004	20,0	0,43	2,47
05.08.2004	20,0	0,52	1,44
06.08.2004	20,0	0,55	0,33
Maus 4 C			
19.07.2004	20,0	0,55	0
20.07.2004	20,0	0,07	1,15
21.07.2004	20,0	0,38	1,64
22.07.2004	20,0	0,26	1,26
23.07.2004	20,0	0,17	1,18
26.07.2004	20,0	0,19	1,46
27.07.2004	20,0	0,27	1,18
28.07.2004	20,0	0,14	0,52
29.07.2004	20,0	0,10	1,71
30.07.2004	20,0	0,17	1,85
02.08.2004	20,0	0,12	2,29
03.08.2004	20,0	0,67	2,56
04.08.2004	20,0	0,28	3,25
05.08.2004	20,0	0,28	1,28
06.08.2004	20,0	0,43	0,02

Anhang

Maus 5 C			
19.07.2004	20,0	0,57	0,71
20.07.2004	20,0	0,28	1,41
21.07.2004	20,0	0,04	1,50
22.07.2004	20,0	0,06	1,39
23.07.2004	20,0	0,15	1,36
26.07.2004	20,0	0,21	1,19
27.07.2004	20,0	0,03	1,08
28.07.2004	20,0	0,05	1,25
29.07.2004	20,0	0,03	0,98
30.07.2004	20,0	0,16	1,19
02.08.2004	20,0	0,12	1,08
03.08.2004	20,0	0,03	1,20
04.08.2004	20,0	0,07	1,41
05.08.2004	20,0	0,09	1,30
06.08.2004	20,0	0,05	0,11
Maus 6 C			
19.07.2004	20,0	0,79	0,57
20.07.2004	20,0	0,22	1,52
21.07.2004	20,0	0,11	1,55
22.07.2004	20,0	0,29	1,75
23.07.2004	20,0	0,51	1,47
26.07.2004	20,0	0,09	1,32
27.07.2004	20,0	0,38	1,10
28.07.2004	20,0	0,07	1,28
29.07.2004	20,0	0,09	1,26
30.07.2004	20,0	0,26	1,23
02.08.2004	20,0	0,11	1,35
03.08.2004	20,0	0,29	1,06
04.08.2004	20,0	0,05	1,12
05.08.2004	20,0	0,08	1,10
06.08.2004	20,0	0,83	0,28

Anhang

Maus 7 C			
19.07.2004	20,0	1,90	0,77
20.07.2004	20,0	0,03	1,60
21.07.2004	20,0	0,86	2,15
22.07.2004	20,0	0,53	2,16
23.07.2004	20,0	1,51	1,86
26.07.2004	20,0	0,94	1,99
27.07.2004	20,0	0,89	1,91
28.07.2004	20,0	0,80	2,04
29.07.2004	20,0	0,27	2,49
30.07.2004	20,0	1,31	2,39
02.08.2004	20,0	1,47	0,99
03.08.2004	20,0	1,11	1,67
04.08.2004	20,0	1,46	1,53
05.08.2004	20,0	1,95	1,47
06.08.2004	20,0	1,13	0,04
Maus 8 C			
19.07.2004	20,0	0,47	0,68
20.07.2004	20,0	0,78	2,11
21.07.2004	20,0	0,80	2,92
22.07.2004	20,0	0,68	1,38
23.07.2004	20,0	1,94	1,37
26.07.2004	20,0	0,50	4,91
27.07.2004	20,0	0,97	6,15
28.07.2004	20,0	0,68	4,03
29.07.2004	20,0	0,57	8,33
30.07.2004	20,0	1,20	1,67
02.08.2004	20,0	1,14	1,61
03.08.2004	20,0	1,28	1,40
04.08.2004	20,0	0,45	1,59
05.08.2004	20,0	0,89	2,95
06.08.2004	20,0	0,50	0,45

Anhang

Maus 9 C			
19.07.2004	20,0	0,76	0,98
20.07.2004	20,0	0,82	2,09
21.07.2004	20,0	2,00	2,48
22.07.2004	20,0	2,22	1,34
23.07.2004	20,0	2,16	1,48
26.07.2004	20,0	1,94	1,86
27.07.2004	20,0	1,20	1,65
28.07.2004	20,0	0,97	1,14
29.07.2004	20,0	0,71	3,98
30.07.2004	20,0	1,05	1,89
02.08.2004	20,0	0,93	1,55
03.08.2004	20,0	1,15	2,18
04.08.2004	20,0	0,64	3,12
05.08.2004	20,0	0,96	1,96
06.08.2004	20,0	0,53	1,03
Maus 10 C			
19.07.2004	20,0	0,22	0,72
20.07.2004	20,0	0,46	1,66
21.07.2004	20,0	2,16	2,75
22.07.2004	20,0	2,37	3,26
23.07.2004	20,0	2,08	2,48
26.07.2004	20,0	1,42	2,49
27.07.2004	20,0	0,42	1,15
28.07.2004	20,0	0,97	1,30
29.07.2004	20,0	0,66	1,67
30.07.2004	20,0	1,20	1,78
02.08.2004	20,0	0,62	1,64
03.08.2004	20,0	0,54	0,96
04.08.2004	20,0	0,35	1,17
05.08.2004	20,0	0,48	1,18
06.08.2004	20,0	0,04	0

Tab. IV: Übersicht über die gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g der Mäuse der Gruppe D (orale Behandlung mit ATC-Reinsubstanz)

Mäuse-Gruppe D (ATC orale Applikation)			
Maus 11 D	ATC in µg	Urinmenge in g	Kotmenge in g
19.07.2004	20,0	0,53	0,94
20.07.2004	20,0	0,17	0,90
21.07.2004	20,0	0,21	1,06
22.07.2004	20,0	0,09	0,98
23.07.2004	20,0	0,19	1,22
26.07.2004	20,0	0,29	1,66
27.07.2004	20,0	0,04	1,57
28.07.2004	20,0	0,30	1,18
29.07.2004	20,0	0,12	1,23
30.07.2004	20,0	0,14	1,90
02.08.2004	20,0	0,20	0,89
03.08.2004	20,0	1,01	1,06
04.08.2004	20,0	0,52	5,51
05.08.2004	20,0	0,74	1,33
06.08.2004	20,0	0,54	0,59
Maus 12 D			
19.07.2004	20,0	0,06	0,59
20.07.2004	20,0	0,48	1,81
21.07.2004	20,0	1,63	2,79
22.07.2004	20,0	1,74	2,15
23.07.2004	20,0	1,69	1,65
26.07.2004	20,0	0,60	1,64
27.07.2004	20,0	0,12	0,73
28.07.2004	20,0	0,86	1,46
29.07.2004	20,0	0,18	1,37
30.07.2004	20,0	0,30	1,22

Anhang

02.08.2004	20,0	0,06	1,12
03.08.2004	20,0	1,23	0,55
04.08.2004	20,0	0,04	1,09
05.08.2004	20,0	0,09	1,72
06.08.2004	20,0	0,23	1,01
Maus 13 D			
19.07.2004	20,0	0,50	0,00
20.07.2004	20,0	0,67	1,80
21.07.2004	20,0	1,32	1,29
22.07.2004	20,0	1,79	1,16
23.07.2004	20,0	1,40	1,76
26.07.2004	20,0	1,24	1,51
27.07.2004	20,0	0,90	1,64
28.07.2004	20,0	0,32	1,13
29.07.2004	20,0	0,74	1,56
30.07.2004	20,0	0,51	1,70
02.08.2004	20,0	1,28	1,23
03.08.2004	20,0	1,67	1,48
04.08.2004	20,0	1,54	1,75
05.08.2004	20,0	0,61	1,23
06.08.2004	20,0	1,15	0,34
Maus 14 D			
19.07.2004	20,0	0,75	0,53
20.07.2004	20,0	0,21	1,36
21.07.2004	20,0	1,53	1,49
22.07.2004	20,0	0,64	1,12
23.07.2004	20,0	0,99	1,06
26.07.2004	20,0	0,42	1,14
27.07.2004	20,0	0,09	0,86
28.07.2004	20,0	0,45	0,92
29.07.2004	20,0	0,27	1,47
30.07.2004	20,0	0,48	1,30

Anhang

02.08.2004	20,0	0,42	1,19
03.08.2004	20,0	0,40	1,44
04.08.2004	20,0	0,21	1,54
05.08.2004	20,0	0,59	1,47
06.08.2004	20,0	0,31	0,65
Maus 15 D			
19.07.2004	20,0	1,23	0,95
20.07.2004	20,0	0,29	1,07
21.07.2004	20,0	0,61	2,05
22.07.2004	20,0	1,75	1,47
23.07.2004	20,0	0,53	2,42
26.07.2004	20,0	1,14	4,04
27.07.2004	20,0	0,95	2,09
28.07.2004	20,0	0,28	1,30
29.07.2004	20,0	0,64	3,64
30.07.2004	20,0	0,40	2,31
02.08.2004	20,0	0,12	1,43
03.08.2004	20,0	0,67	1,39
04.08.2004	20,0	0,20	1,38
05.08.2004	20,0	0,24	1,05
06.08.2004	20,0	0,09	0,28
Maus 16 D			
19.07.2004	20,0	0,33	1,00
20.07.2004	20,0	0,44	1,17
21.07.2004	20,0	1,98	1,79
22.07.2004	20,0	2,27	1,65
23.07.2004	20,0	2,14	1,94
26.07.2004	20,0	1,40	2,29
27.07.2004	20,0	2,07	1,14
28.07.2004	20,0	1,48	1,30
29.07.2004	20,0	1,32	1,38
30.07.2004	20,0	1,82	2,03

Anhang

02.08.2004	20,0	1,69	1,48
03.08.2004	20,0	1,92	1,60
04.08.2004	20,0	2,17	1,68
05.08.2004	20,0	1,36	1,67
06.08.2004	20,0	2,05	1,09
Maus 17 D			
19.07.2004	20,0	2,16	0,27
20.07.2004	20,0	1,31	1,30
21.07.2004	20,0	2,08	1,91
22.07.2004	20,0	2,25	1,63
23.07.2004	20,0	1,95	1,91
26.07.2004	20,0	1,61	1,75
27.07.2004	20,0	2,02	1,07
28.07.2004	20,0	1,29	1,36
29.07.2004	20,0	1,96	2,03
30.07.2004	20,0	0,91	3,64
02.08.2004	20,0	0,89	2,59
03.08.2004	20,0	0,93	2,36
04.08.2004	20,0	1,02	4,49
05.08.2004	20,0	2,00	1,56
06.08.2004	20,0	0,13	0,43
Maus 18 D			
19.07.2004	20,0	0,75	0,30
20.07.2004	20,0	0,05	1,06
21.07.2004	20,0	0,00	1,98
22.07.2004	20,0	0,31	2,30
23.07.2004	20,0	0,37	2,62
26.07.2004	20,0	0,57	1,40
27.07.2004	20,0	0,16	1,07
28.07.2004	20,0	0,44	0,90
29.07.2004	20,0	0,56	1,19
30.07.2004	20,0	0,48	1,31

Anhang

02.08.2004	20,0	0,16	1,77
03.08.2004	20,0	0,89	1,67
04.08.2004	20,0	0,37	1,33
05.08.2004	20,0	0,42	1,08
06.08.2004	20,0	0,14	0,28
Maus 19 D			
19.07.2004	20,0	1,60	0,00
20.07.2004	20,0	0,46	1,46
21.07.2004	20,0	1,37	3,64
22.07.2004	20,0	0,89	1,77
23.07.2004	20,0	1,06	2,15
26.07.2004	20,0	1,12	3,68
27.07.2004	20,0	1,29	3,88
28.07.2004	20,0	1,69	0,82
29.07.2004	20,0	0,59	4,28
30.07.2004	20,0	1,28	3,05
02.08.2004	20,0	0,71	1,98
03.08.2004	20,0	1,35	2,34
04.08.2004	20,0	0,98	2,49
05.08.2004	20,0	0,79	2,73
06.08.2004	20,0	0,50	0,60
Maus 20 D			
19.07.2004	20,0	0,41	0,16
20.07.2004	20,0	0,21	1,19
21.07.2004	20,0	0,57	4,94
22.07.2004	20,0	0,53	2,70
23.07.2004	20,0	0,83	3,52
26.07.2004	20,0	0,95	6,04
27.07.2004	20,0	0,96	2,94
28.07.2004	20,0	0,35	3,22
29.07.2004	20,0	0,60	2,58
30.07.2004	20,0	0,40	1,25

Anhang

02.08.2004	20,0	0,04	1,22
03.08.2004	20,0	0,27	1,49
04.08.2004	20,0	0,09	1,96
05.08.2004	20,0	0,10	2,38
06.08.2004	20,0	0,45	0,48

9.3 Verzeichnis der Hersteller

AB BIODISK

S-169 56 Solna (Schweden)

Alpha RVC

Martin Christ GmbH

37520 Osterode

Fa. Altromin

32791 Lage-Lippe

Arcos Organics

B-2440 Geel (Belgien)

bioMerieux®sa France

72622 Nürtingen

Carl Roth GmbH & Co KG

76185 Karlsruhe

Charles River GmbH

97633 Sulzfeld

Hermle Labortechnik GmbH

78564 Wehingen

IKA Werke GmbH & Co KG

79219 Staufen

Janssen-Cilag

41470 Neuss

Macherey-Nagel GmbH & Co KG
52355 Düren

Merck Eurolab GmbH
64271 Darmstadt

Oxoid GmbH
46467 Wesel

Shimadzu Deutschland GmbH
47262 Duisburg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
82024 Taufkirchen

VIVA Diagnostika
Diagnostische Produkte GmbH
50858 Köln

9.4 Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Allgemeine Grundstruktur der Tetracycline (Formeln nach HLAVKA u. BOOTHE 1985)	15
Abb. 2:	Strukturformeln von Tetracyclin und 4-Epimer	18
Abb. 3:	Strukturformel von ATC	20
Abb. 4:	Tetracyclin (als Summe aus TC und e-TC) im Urin der Versuchstiere von Gruppe A und C (Mittelwerte & Standardabweichungen)	75
Abb. 5:	Vergleich der MHK-Werte für <i>E. coli</i> -Isolate zu Versuchsbeginn (n = 10) und Versuchsende (n = 60)	85

9.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Pharmakokinetische Daten von Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin (nach KROKER et al. 2002)	17
Tab. 2:	Höchstmengen für Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{L}$) in der Europäischen Union (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY, 1992)	26
Tab. 3:	Höchstmengen für Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln in den Vereinigten Staaten von Amerika (FDA, 1996)	27
Tab. 4:	Qualitativer Tetracyclin-Nachweis in Knochen geschlachteter, tauglich beurteilter Tiere (nach KÜHNE et al., 2000) n: Anzahl untersuchter Tierkörper bzw. Herdensammelproben	29
Tab. 5:	Verwertungsmöglichkeiten für Schlachtnebenprodukte nach Kategorien in der EU (Commission of the European Community, 2002 und Council of the European Community, 1964)	31
Tab. 6:	Verwertung von Knochen geschlachteter, tauglich beurteilter Tiere in der Europäischen Union (Übersicht nach KÜHNE u. MITZSCHERLING 2004)	32

Tab. 7:	Herstellungsbedingungen für Tiermehl und Fleischknochenmehl in der EU (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY 2002) zur Verwendung als Futtermittel	34
Tab. 8:	Bedingungen für die Fließmittel Gradienten	54
Tab. 9	Parameter der massenspektrometrischen Detektion der Tetracycline	54
Tab. 10:	Mittlere Wiederfindungsraten für Tetracyclin aus Knochen (Angaben in %)	59
Tab. 11:	Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Knochenmehls nach dem <u>1.Extraktionstag</u> (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten, n=3)	60
Tab. 12:	Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Knochenmehls nach dem <u>2. Extraktionstag</u> (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten, n=4)	61
Tab. 13:	Gemessener Gesamtgehalt von OTC (nur OTC), TC (Summe aus e-TC, TC, e-ATC, ATC) und CTC (Summe aus e-CTC, CTC, e-ACTC, ACTC) angegeben in µg/kg (Mittelwerte und Standardabweichungen)	62
Tab. 14:	Mittlere Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Tetracyclin in Mäuseurin (Angaben in %)	63
Tab. 15:	Gruppe A: LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse der Urinproben nach Fütterung mit Knochenmehl (** = nicht analysiert, zu geringes Probevolumen; n.n. = nicht nachweisbar)	64
Tab. 16:	Gruppe C: LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse der Urinproben nach oraler Behandlung mit Tetracyclin-Reinsubstanz (** = nicht analysiert, zu geringes Probenvolumen)	66
Tab. 17:	Gruppe D: LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse der Urinproben nach oraler Behandlung mit Anhydrotetracyclin-Reinsubstanz (n.n. = nicht nachweisbar)	68

Tab. 18:	Oral aufgenommenes Tetracyclin (als Summe aus Tetracyclin und e-Tetracyclin), aufgefangene Urinmenge, sowie absolut und relativ über den Urin ausgeschiedene Tetracyclin-Anteile für Tiere der Gruppe A (** = nicht analysiert, zu geringes Probevolumen;)	69
Tab. 19:	Gruppe C: Oral appliziertes Tetracyclin, aufgefangene Urinmenge, sowie absolut und relativ über den Urin ausgeschiedene Tetracyclin-Anteile (als Summe aus Tetracyclin und e-Tetracyclin für Tiere der Gruppe C(** = nicht analysiert, zu geringes Probevolumen)	71
Tab. 20:	Gruppe D: Oral appliziertes Anhydrotetracyclin, aufgefangene Urinmenge, sowie absolut und relativ über den Urin ausgeschiedene Anhydrotetracyclin-Anteile (als Summe aus ATC und e-ATC) für Tiere der Gruppe D (n.n. = nicht nachweisbar)	73
Tab. 21:	Statistische Auswertung der LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse nach Normierung auf die aufgenommene Wochenmenge	78
Tab. 22:	Statistische Auswertung der LC-ESI-MS-MS-Messergebnisse nach Normierung auf die aufgenommene Gesamtmenge	80
Tab. 23:	TC-, CTC- und ATC-Gehalte der Oberschenkelknochen (Summe aus Muttersubstanz und Epimer) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	82
Tab. 24:	MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei <i>E. coli</i> -Isolaten vor und nach Knochenmehlfütterung / Gruppe A (Angaben in $\mu\text{g}/\text{ml}$)	86
Tab. 25:	MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei <i>E. coli</i> -Isolaten vor und nach oraler Applikation von TC-Reinsubstanz Gruppe C (Angaben in $\mu\text{g}/\text{ml}$)	87
Tab. 26:	MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei <i>E. coli</i> -Isolaten vor und nach oraler Applikation von ATC-Reinsubstanz Gruppe D (Angaben in $\mu\text{g}/\text{ml}$)	88

Tab. 27:	MHK-Werte mit statistischer Auswertung für Tetracyclin bei <i>E.coli</i> -Isolaten vor und nach Versuchsende der Kontrollgruppe B (keine Behandlung) (Angaben in µg/ml)	89
Tab. I:	Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Tetracyclinen aus Knochen (nach Schulze 2003)	119
Tab. II:	Übersicht über die aufgenommenen Knochen-, TC und CTC-Mengen in µg durch die Mäuse der Gruppe A, sowie der gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g	120
Tab. III:	Übersicht über die gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g der Mäuse der Gruppe C (orale Behandlung mit TC-Reinsubstanz)	126
Tab. IV:	Übersicht über die gewonnenen Urinmengen und Kotmengen in g der Mäuse der Gruppe D (orale Behandlung mit ATC-Reinsubstanz)	131

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation:

Entwicklung eines Modells zur Bestimmung der sekundären Bioverfügbarkeit von gebundenen Tetracyclin-Rückständen und Anhydrotetracyclin

selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse durch das Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover und durch meinen Cousin Dr. rer. nat. Dipl. Physiker Stefan Wüstenbecker.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderen Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgender Institution angefertigt:

Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

(Silke Mehlhose-Koch)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Kühne für die Übernahme der Dissertation und die Überlassung des aktuellen und interessanten Themas. Mit nicht endender Geduld und immer wieder aufmunternden Worten hat er mich durch die Versuchszeit und auch durch die Zeit des Zusammenschreibens begleitet und so in beeindruckender Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dem Team vom Zentrum für Lebensmittelwissenschaften möchte ich für die Hilfe während der Versuchsvorbereitung und die Unterstützung bei der mikrobiologischen Untersuchung der Proben danken.

Besonders erwähnt sei Frau Gisela Möller, die mich für die Analyse der Knochenmehlproben so freundschaftlich in ihrem HPLC-Labor aufgenommen und unterstützt hat.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, insbesondere Herrn Prof. Kietzmann, danke ich für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung während der gesamten Versuchszeit. Besonderer Dank gebührt ebenfalls Frau Viktoria Garder und Herrn Hans Herbert Bohr, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, sowie Herrn Dr. Wolfgang Bäumer und Herrn Dr. Michael Braun, die mir (auch telefonisch) immer bereitwillig geholfen haben, meine Fragen aus der Welt zu schaffen.

Herrn Rust vom Institut für Tierernährung sei für die Bereitstellung der Probenmühle und seine wertvollen Tipps und telefonischen Auskünfte gedankt.

Dem Institut für Lebensmitteltoxikologie, vor allem Herrn Dr. Gerd Hamscher und Frau Beate Prieß, möchte ich für die herzliche Aufnahme in ihr Labor danken. Die vielen fachlichen Auskünfte und die tatkräftige Unterstützung bei der Analyse der gewonnenen Proben haben in erheblichem Maß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinem Cousin Herrn Dr. Stefan Wüstenbecker sei herzlich gedankt für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Nochmals herzlichen Dank dafür, dass Du Dir trotz Deiner Arbeit so spontan und hilfsbereit Zeit für mich genommen hast!

Frau Soumaya Katherine Lhafi sei für den PC-Notdienst und die Hilfe beim Layout dieser Arbeit herzlichst gedankt!

Meiner Freundin Antje Katrin Bednarek möchte ich für die vielen endlosen Telefonate während des Studiums und der Doktorandenzeit und die ständige gegenseitige Motivierung herzlichst danken. Deine spontanen "Hilfsaktionen" sind wirklich einmalig!

Meinem lieben Ehemann Michael möchte ich für die Unterstützung während meines Studiums und auch während meiner Doktorandenzeit ganz besonders danken. Ohne Dich wäre sicherlich vieles nicht möglich gewesen.

Meinen beiden lieben Söhnen Daniel und Tobias möchte ich dafür danken, dass sie soviel Verständnis dafür aufgebracht haben, dass ihre Mama teilweise recht wenig Zeit hatte. Ihr drei habt mir immer wieder Kraft gegeben und Mut gemacht! Gut, dass es Euch gibt!

Großer Dank auch an meine Eltern, meine Schwester, meinen Schwager, meine Patentante, meine Schwiegermutter und meine Freunde, die mich moralisch und auch tatkräftig unterstützt haben, wenn gerade mal wieder "Not am Mann" war.