

Anwendung und Zuverlässigkeit des Delvo®-P-Tests

M. Hässig

Departement für Nutztiere der Universität Zürich

Zusammenfassung

Der Delvo®-P-Test (Gist-brocades nr, Delft, Holland) ist ein biologisches Nachweisverfahren von Hemmstoffen (Antibiotika und Sulfonamide) in der Milch. Der Test ist gemäss Angaben der Vertreiber vor allem für Sammelmilchproben, wie sie in milchverarbeitenden Betrieben vorkommen, ausgelegt. Bei Einzelmilchproben haben sich Probleme in der Interpretation der Resultate ergeben. Es konnte gezeigt werden, dass Puffersysteme, Zellen, Bakterien, Zellinhaltsstoffe und Desinfektionsmittel ohne Anwendung von Antibiotika zu falsch positiven wie auch zu falsch negativen Resultaten führen können. Die Fehlerquote bei Einzelmilchproben kann bis zu 44.8% betragen. Der Test ist nur für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Sammelmilchproben, nicht aber in Einzelmilchproben geeignet.

Schlüsselwörter: Rind – Delvo®-Test – Evaluation

Evaluation of the Delvo®-test

The Delvo®-P-test (Gist-brocades nr, Delft, The Netherlands) is based on biological detection of antibiotics in the milk. According to the procedure of the manufacture the test is suited for bulk milk processing factories. Problems arise when the test is used on milk samples of a single cow. Buffers, cells, bacteria, cell contents, and disinfection without using antibiotics may give false positive and false negative results. An error up to 44.8% was detected on single cow milk samples. The test is well suited for bulk milk, where the processing of milk follows a biological procedure as for cheese. The use on single cow milk samples to prove absence of antibiotics is not recommended.

Key words: bovine – Delvo®-test – evaluation

Einleitung

Der Delvo®-P-Test (Gist-brocades nr, Delft, Holland) stellt ein biologisches Nachweisverfahren für Hemmstoffe (Antibiotika und Sulfonamide) in der Milch dar. Der Test ist gemäss Angaben der Vertreiber vor allem für Sammelmilchproben, wie sie in milchverarbeitenden Betrieben vorkommen, ausgelegt. In Einzelmilchproben können die Resultate durch andere Substanzen, die in der Milch vorkommen, beeinflusst werden (Angelidis et al., 1999). Da der Test von der Interkantonalen Kontrollstelle für Heilmittel (IKS; neu Swissmedic) für das Zulassungsverfahren von neuen Mastitistherapeutika vorgeschlagen wurde, haben sich bei der Auswertung der Einzelmilchproben, sowohl vor wie auch nach der Behandlung, Interpretationsprobleme ergeben. Heute schlägt die Swissmedic den Delvo®-Test und weitere biologische Nachweismethoden von Antibiotikarückständen in der Milch nur noch als Screening-Methode vor. Im weiteren wurden nach positiven Delvo®-Test-Resultaten finanzielle Forderungen gegenüber den Milchproduzenten geltend gemacht, da die abgelieferte

Milch als Hemmstoff-positiv qualifiziert wurde. Der Delvo®-Test wird mit steigender Zellzahl in der Milch positiv. Sezerniertes Lactoferrin und Lysozym dieser Zellen wurden als Ursache festgestellt (Carlson und Björck, 1989). Der Test kann auf verschiedene Weisen beeinflusst werden: Die exogene Zugabe von Säuren und Basen, inklusive Puffersubstanzen, verändern die pH-Verhältnisse und beeinflussen somit das Ergebnis. Desinfektionsmittel, welche die Vermehrung von *Bacillus stearothermophilus* und damit den Glukoseabbau im System verhindern, beeinflussen den Testausgang (Iten, 2001). Das Erhitzen von Milchproben um störende Proteine zu denaturieren, wie es vorgeschlagen wurde, kann auch Betalaktam-Antibiotika denaturieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die Problematik bei der Anwendung des Delvo®-P-Test darzustellen und Faktoren festzuhalten, die bei Einzelmilchproben, insbesondere bei krankhaft veränderter Milch, auftreten und das Testergebnis beeinflussen können.

Tiere, Material und Methoden

Tiere: An 337 Kühen wurde eine «milk-out-study» durchgeführt (Indermaur, 1996). «Milk-out-studies» sind Feldstudien mit dem Ziel, die Absetzfrist der Milch nach antibiotischer Mastitisbehandlung zu bestimmen. Die Kühe stammten aus zwei Praxisgebieten in der Ostschweiz. Tieren mit einer klinischen Mastitis wurden vor der Behandlung und an den Tagen 5, 6 und 7 nach der letzten Behandlung 10 ml Vorge-melk unter klinisch sterilen Kautelen entnommen. Zur Therapie der Mastitis wurde Colistin-sulfat (Virbac Lot: 150110 B) eingesetzt (Indermaur, 1996). Bei sämtlichen Milchproben wurde der Delvo®-P-Test durchgeführt.

Delvo®-P-Test: Der Delvo®-P-Test (Ampullentest der Firma Gist-brocades nr, Delft, Holland) basiert auf einem biologischen System, wobei ein Mikroorganismus (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) in einem Agarmedium in Sporenform zur Verfügung gestellt wird. Dieses Bakterium hat ein Wachstumsoptimum bei 64°C und wird durch verschiedene Antibiotika im Wachstum gehemmt. Können die Bakterien hingegen wachsen, produzieren sie Säure, die mit Hilfe eines Farbindikators (Bromcresolpurpur), der bei pH 5.2 von violett nach gelb umschlägt, nachgewiesen wird. Alle Proben wurden im Doppel angesetzt. War einer der doppelten Testansätze positiv und einer negativ, wurde das Resultat als «fraglich» bezeichnet. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde Phosphatpuffer (20 mM, pH 7.2, s. u.) verwendet um sicher zu stellen, dass keine Bakterien oder Zellsubstanzen den Test beeinflussen können.

pH- und Konzentrationsunterschiede: Änderungen, wie sie in Milch von Kühen mit Mastitiden vorkommen können, wurden mittels eines Phosphatpuffersystems aus Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ in verschiedenen Konzentrationen von 0.1 M, 0.01 M und 0.001 M und verschiedenen pH-Werten in Reihen von pH 8.0 bis pH 4.5 mit Abständen von pH 0.1 untersucht.

Antibiotika: Ampicillin trihydrat (Virbac Lot 149177, 98.03%) wurde auf 0.05 mg/l in H₂O verdünnt. Colistin-sulfat (Virbac Lot: 150110 B, 20090 UI/mg) wurde auf 0.2 mg/l oder 1005 IU/l verdünnt und 0.1 IU pro Test eingesetzt.

Da Betalaktamantibiotika beim Erhitzen schnell ihre biologische Aktivität verlieren (Nefel et al., 1983) und unsachgemässe Probenlagerung zu falsch negativen Resultaten führen könnte wurde von jedem Antibiotika ein Aliquot 2 Minuten auf 100°C erhitzt.

Bakterien: Eine Mischkultur aus isolierten Mastitis-Erregern (*E. coli*, Streptokokken spp., Staphylokokken spp. und *A. pyogenes*, Total 1000 KBE/ml) wurde in Phosphatpuffer (phosphatgepufferte Salzlösung, 20 mM, pH 7.2) oder in UHT-Milch suspendiert um deren allfällige Interaktion mit dem Testkeim zu über-

prüfen. Ein Aliquot wurde 2 Minuten auf 100°C erhitzt, ein Aliquot 30 Sekunden mit Ultraschall (100 W/ml) beschallt um die Bakterien zum Platzen zu bringen und so intrazelluläre Substanzen freizusetzen. **Leukozyten:** Diese wurden isoliert um den alleinigen Einfluss einer erhöhten Zellzahl, wie sie bei Mastitiden üblich ist, zu beurteilen. Die Leukozyten wurden in Phosphatpuffer respektive UHT-Milch suspendiert (10⁶ Zellen/Testansatz). Je ein Aliquot wurde 2 Minuten auf 100°C erhitzt oder mit Ultraschall (s. o.) behandelt.

Blutserum: Sezernierte Substanzen von Zellen können den Test beeinflussen. Serum einer klinisch gesunden Kuh und einer Kuh mit einer akuten Mastitis, vor der Therapie, wurden unverdünnt verwendet.

Desinfektionsmittel: Rückstände der Euterzitzenkuppenreinigung können in die zu untersuchende Milchprobe gelangen. Lösungen von 0.01% und 1% v/v Äthanol in H₂O wurden hergestellt.

Eine 0.01% und 1% v/v Lösung des Inhaltes eines Desinfektionstuches (Veterinaria AG, Zürich, *Benzalkonium chloratum* 100 mg, *Isopropanolum* 60 ml ad 100 ml) wurde in H₂O hergestellt. (Grund s. o.).

Eine 0,1% und 1% v/v Gebrauchslösung in Wasser einer Zitzentauchlösung (Lactasept®, Chassot, Bern, *Glutaralum* 1.5 g/100 ml) wurden hergestellt.

Proteinmuster: Von zwei unbehandelten Kühen aus dem gleichen Bestand (Stigenhof, Aussenstation des Tierspital Zürich) mit je einem positiven und negativen Delvo®-P-Test-Ergebnis, wurden Milchproben entnommen und nach Entfettung einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (8%) unterzogen. Die Proteinbanden wurden mittels Silberfärbung visualisiert (Hässig, 1986), um allfällige Unterschiede im Proteinmuster feststellen zu können.

Ergebnisse

Die «milk-out-study» ergab, dass lediglich 55.2% der Kühe am erkrankten Viertel vor der Behandlung ein Delvo®-P-Test negatives Resultat zeigten (Tab. 1). Es besteht kein statistischer Zusammenhang zwischen Testergebnis, Mastitisgrad oder Sekretveränderung (Indermaur, 1996). Aus Tabelle 2 geht hervor, wie sich der Verlauf des Delvo-Tests am Tag 5, 6 und 7 nach Abschluss der antibiotischen Behandlung dar-

Tabelle 1: Delvo®-P-Test Resultate der «milk-out-study» an Kühen (n = 337) mit klinischer Mastitis vor der Initialbehandlung.

Ergebnis	N	%
Negativ	186	55.2
Fraglich	108	32.1
Positiv	43	12.7

Tabelle 2: Delvo®-P-Test Resultate der «milk-out-study» an Kühen (n = 343) mit klinischer Mastitis nach einmaliger Behandlung.

Tag	Positiv	davon erneut	neu	immer
5	28	–	–	–
6	26	10	16	–
7	20	8	8	4

stellt. Auffallend ist dabei, dass am Tag 6 nach der Behandlung 16 Proben von gesamthaft 343 Proben Delvo®-P-Test-positiv, am Tag 5 aber noch negativ waren und am Tag 7 acht Proben positiv wurden, welche am Tag zuvor negativ waren. 160 Milchproben wurden zur Durchführung des Delvo®-P-Tests einem zweiten Labor übergeben. In 19 Fällen (11.8%) wurde eine Abweichung festgestellt. Die Testwiederholung im gleichen Labor mit 30 Proben ergab eine Abweichung in drei Fällen (10%).

Eine 0.1 M Phosphatpufferlösung mit pH-Werten > 6.0 vermögen die Säurebildung des Testes so weit zu puffern, dass die Reaktion falsch positiv beurteilt wird. Pufferlösungen in geringerer Konzentration und solche mit tieferen pH-Werten beeinflussen das Ergebnis nicht. Ampicillin reagiert positiv, sowohl normal gelöst, als auch nach kurzzeitiger Hitzebehandlung. Colistin kann in der vorgegebenen Konzentration mit dem Delvo®-P-Test nicht nachgewiesen werden. Die bakteriellen Mischkulturen (nativ, hitzeinaktiviert, nach Ultraschallbehandlung) und die Leukozytenpräparation vermochten die Reaktion nicht zu stören, sofern die Erreger bzw. Zellen in UHT-Milch suspendiert waren. Wurden die gleichen Erreger bzw. Zellen in Phosphatpuffer suspendiert und dem System zugegeben, so zeigte der Test ein positives Resultat. Sowohl Äthanol wie auch die beiden Desinfektionsmittel in 1%-iger Konzentration liessen den Test positiv ausfallen. Die niedrigeren Konzentrationen liessen den Test unbeeinflusst. Unverdünntes Blutserum lässt den Test positiv ausfallen. Die Pufferkapazität von Blutserum ist offensichtlich ausreichend, um die im Testsystem anfallenden Valenzen zu neutralisieren (Tab. 3).

Die Gelelektrophorese von Delvo®-P-Test positiver und negativer Milch zweier Kühe, welche beide unbehandelt waren und aus dem gleichen Bestand stammten, ergab unterschiedliche Proteinbanden bei 170, 41, 16 und 7 kD (Tab. 4). Die Delvo®-P-Test positive Milch zeigte bei 16 kD eine deutlich stärkere Bande als die negative Milch der anderen Kuh.

Diskussion

Der Delvo®-P-Test ist ein biologischer Test, der sich eines lebenden Organismus bedient, mit dem Hemm-

stoffe in der Milch nachgewiesen werden können. Cullor (1993) konnte zeigen, dass der Delvo®-Test bei klinischen Mastitiden in 25%, bei chronischen Mastitiden in 37.7%, im Kolostrum in 16% und in der Kannenmilch in 7.9% zu falsch positiven Resultaten führte (Van Eenennaam et al., 1993). Delvo®-Test positive Sammelmilchproben der Ablieferungsmilch werden in der Schweiz nur in tiefen, einstelligen Promillebereich gefunden und selbst davon ist der Grossteil nicht falsch positiv. Wie der Hersteller erwähnt, können verschiedene Faktoren den Test beeinflussen. Diese Faktoren spielen in der Sammelmilchprobe keine grosse Rolle, da sie verdünnt werden (Angelidis et al., 1999), in der Einzelmilchprobe kommen sie jedoch zum Tragen.

Tabelle 3: Beeinflussung des Delvo®-Tests durch verschiedene Substanzen. «Falsch positiv» bezieht sich auf ein positives Resultat, ohne Antibiotikazusatz. «Falsch negativ» bezieht sich auf ein negatives Resultat mit Antibiotikazusatz.

Was	falsch positiv	falsch negativ
Phosphatpuffer (0.02M, pH 7.2)	–	–
UHT-Milch	–	–
Colistin-sulfat, 0.1 IU	–	–
Phosphatpuffer, basisch gepuffert, 1M, (> pH 5.9)	+	–
Phosphatpuffer, basisch gepuffert, ≤ 0.01M, (> pH 5.9)	–	–
Phosphatpuffer, sauer gepuffert, 1M, (> pH 5.9)	–	+
Phosphatpuffer, sauer gepuffert, ≤ 0.01M, (> pH 5.9)	–	–
Bakterien in Phosphatpuffer, (0.02M, pH 7.2)	+	–
Bakterien in UHT Milch	–	–
Leukozyten, nativ in Phosphatpuffer	+	–
Leukozyten, nativ in UHT Milch	–	–
Leukozyten, erhitzt, in Phosphatpuffer	+	–
Leukozyten, erhitzt, in UHT Milch	–	–
Leukozyten, geschallt, in Phosphatpuffer	+	–
Leukozyten, geschallt in UHT Milch	–	–
Leukozyten, erhitzt und beschallt, in Phosphatpuffer	+	–
Leukozyten, erhitzt und beschallt, in UHT Milch	–	–
0.01% Äthanol	–	–
1% Äthanol	+	–
0.01% «Zitzentuch»	–	–
1% «Zitzentuch»	+	–
0.1% Zitzentaucher	–	–
1% Zitzentaucher	+	–
Serum, gesunde Kuh	+	–
Serum, Mastitiskuh, vor Behandlung	+	–

Tabelle 4: Unterschiedlich starke Proteinbanden in einer Polyacrylamid (8%) Gelelektrophorese von einer Delvo®-P-Test positiven und negativen Milch zweier unbehandelte Kühe aus dem gleichen Bestand.

Rt	MG	Bandenintensität Delvo®-P-Test	
		positiv	negativ
0.15	170kD	–	+
0.54	41kD	++	+
0.79	16kD	+++	+
0.91	7kD	++	–

In der Mastitismilch steigt der Zellgehalt und damit nimmt auch die Möglichkeit zu, dass intrazelluläre Substanzen der mononukleären Zellen, Prostaglandine, Interleukine, Proteasen oder Immunglobuline freigesetzt werden. Der pH-Wert wird in erster Linie durch Konzentrationsänderungen von Elektrolyten und Bikarbonat beeinflusst und nur marginal durch eventuell freiwerdende intrazelluläre Proteine. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Zellen und Zellbestandteile den Test nicht beeinflussen, wenn sie in Milch suspendiert sind. Zudem steigt der Gehalt an Substanzen der Puffersysteme des Blutes, Bikarbonate, Carboanhydratase, Natrium, Kalium, Chlorid, Glutamin- und Aminosäuren, welche die Reaktion des Delvo®-Tests beeinflussen können und falsch-positive Resultate liefern. Im Gegensatz zur Verkehrsmilch können in Folge fehlender Verdünnung bei Einzelmilchproben von Kühen mit Mastitiden verschiedene Bakterien den Test ebenfalls beeinflussen. Ein basebildender Keim könnte die Milch so stark puffern, dass die Säurebildung des Testkeimes nicht genügt, den Farbumschlag zu bewirken. Das Resultat wäre in diesem Fall falsch-positiv und ein therapieresistenter, säurebildender Keim könnte ein falschnegatives Resultat bewirken (Ma et al., 2001). Im Versuch mit Ampicillin, konnte eine Denaturierung durch Erhitzung nicht bestätigt werden. Arbeiten von Neftel (1983) haben gezeigt, dass Penicillin G schon bei 56°C in 3 Stunden vollständig degradiert wird. Zudem sind Proteasen sehr hitzestabil (bis 80°C). Dies zeigt, dass Hitzebehandlung ungeeignet ist, um bessere Resultate zu erzielen, da eine genügende Erhitzung zur Proteindenaturierung auch die

Gefahr einer Antibiotikazerstörung beinhaltet. Die Gelelektrophorese von unbehandelten Kühen mit unterschiedlichem Delvo®-P-Test-Resultat hat unterschiedliche Proteinmuster ergeben.

Gemäss der interkantonalen Kontrollstelle für Heilmittel, IKS (neu Swissmedic), wurden folgende Richtlinien im Zusammenhang mit dem Delvo®-Test erlassen (Merkblatt der IKS vom 17. August 1998 betreffend die empfohlene Versuchsanordnung zur Prüfung des Ausscheidungsverhaltens und der Euterträglichkeit): «Bei Laktationspräparaten ist der quantitative Nachweis durchzuführen. Für Trockensteller gilt, dass alle Proben einem Screening-Test unterzogen werden, der die Wirkstoffmengen im Bereich der geltenden Höchstkonzentrationen sicher erfasst. In eventuell positiven Proben sind die Rückstände in jedem Fall zu identifizieren und zu quantifizieren.» Dies zeigt, dass der Delvo®-Test bei der Zulassung von Euterpräparaten nur noch zu Screening-Zwecken empfohlen wird. Aus den Arbeitsunterlagen von Gist-brocades nr, Delft, Holland, ist ersichtlich, dass mit dem Delvo®-Test eine Vielzahl von Antibiotika nicht auf dem Niveau der MRL (Maximum Residue Levels, maximale Rückstandskonzentrationen) nachgewiesen werden kann. Er ist damit für viele Wirkstoffe nicht geeignet um Zulassungsfragen abzuklären.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Puffersysteme, Zellen, Bakterien, Zellinhaltsstoffe und Desinfektionsmittel ohne Anwendung von Antibiotika den Delvo®-Test beeinflussen. Ein negativer Delvo®-Test in der Sammelmilchprobe garantiert dem Milchkäufer, dass die Milch verarbeitungstauglich ist. Er garantiert nicht die Freiheit von antibiotisch wirksamen Substanzen auf dem Niveau der MRL. Grobsinnlich veränderte Milch, Mastitismilch, Milch mit erhöhtem Zellgehalt, Kolostrum etc. darf gemäss Lebensmittelgesetzgebung ohnehin nicht abgeliefert werden, unabhängig vom Resultat eines Hemmstofftestes. Gerade solche Milch ist es aber, welche oftmals sogenannte falsche Resultate liefert. Der Gebrauch des Delvo®-Test für Einzelmilchproben zwecks Nachweis von Antibiotikarückständen ist unserer Ansicht nach nicht sinnvoll, da falsch positive Resultate den Milchproduzenten diskriminieren und falsch negative Resultate dem Konsumenten Qualitätsfehler verschleiern.

Essai contrôle avec le test Delvo-P®

Le test Delvo-P® (Gist-brocades, Delft, Pays-Bas) est une méthode de détermination biologique pour la démonstration de la présence de substances inhibitrices (antibiotiques et sulfamides) dans le lait. Le test a été développé selon les données du producteur surtout pour des échantillons collectifs de lait qui sont prélevés dans des exploitations avec mise en valeur du lait. En ce qui concerne les échantillons individuels, des problèmes dans l'interprétation des résultats ont été observés. Il a pu être démontré que des systèmes tampons, des cellules, des bactéries, des substances cellulaires, des manipulations des trayons et des mamelles sans emploi d'antibiotiques ont conduit à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Le taux d'erreur pour les échantillons individuels peut atteindre 44,8%. Le test est adéquat uniquement pour la détection de résidus d'antibiotiques dans des échantillons collectifs et pas dans les échantillons individuels.

Esperimento di controllo con il test Delvo®

Il Delvo®-Test-P (Gist-brocades nr, Delft, Holland) è un procedimento biologico per la dimostrazione di inibitori (antibiotici e sulfonamidici) nel latte. Secondo le indicazioni del rappresentante il test è adatto soprattutto per i campioni collettivi di latte delle aziende che lavorano il latte. Per campioni singoli di latte sono sorti problemi nell'interpretazione dei risultati. È stato mostrato che sistemi tampone, cellule, batteri, sostanze contenute nelle cellule, manipolazioni alla mammella senza l'utilizzo di antibiotici possono portare sia a risultati erroneamente positivi che a risultati erroneamente negativi. La quota di errori nei campioni singoli di latte può arrivare fino al 44,8%. Il test è adatto soltanto per la dimostrazione di residui di antibiotici in campioni collettivi di latte, non è però adatto per campioni singoli di latte.

Literatur

Angelidis A.S., Farver T.B., Cullor J.S.: Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J. Food Prot.* 1999, 62:1183–90.

Carlson Å., Björck L.: Lactoferrin and Lysozyme in Milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvo-test P. *J. Dairy Sci.* 1989, 72:3166–75.

Cullor J.S.: Antibiotic residue tests for mammary gland secretions. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 1993, 9:609–20.

Hässig M.: Isolierung und Charakterisierung von DNS-Polymerase-alpha-Holoenzymen aus dem Thymus des Kalbes. Dissertation, Universität Zürich, 1986.

Indermaur B.: Wirksamkeit und Rückstandsuntersuchungen von zwei Antibiotikapräparaten zur Mastitisbehandlung beim Rind. Dissertation, Universität Zürich, 1996.

Iten C.: Untersuchungen zur Behandlung der akuten Mastitis mit Gentapen®. Dissertation, Universität Zürich, 2001.

MaY., Barbaano D.M., Hotchkiss J.H., Murphy S., Lynch J.M.: Impact of CO₂ addition to milk on selected analytical testing methods. *J. Dairy Sci.* 2001, 84:1959–68.

Neftel K.A., Müller M.R., Walti M., Erni J., Gugler M., Arenbrecht S.: Penicillin-G degradation products inhibit in vitro granulopoiesis. *Br. J. Haematol.* 1983, 54:255–60.

Van Eenennaam A.L., Cullor J.S., Perani L., Gardner I.A., Smith W.L., Dellinger J., Guterbock W.M., Jensen L.: Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 1993, 76:3041–53.

Korrespondenzadresse

PD Dr. med. vet, MPH FVH M. Hässig, Departement für Nutztiere, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich, E-Mail: mhaessig@vetclinics.unizh.ch

Manuskripteingang: 9. Oktober 2001

In vorliegender Form angenommen: 13. August 2002