

Abschlussbericht

Durchführung eines Evaluationsverfahrens für ein Antibiotika/Tierarzneimittel- Multi-Screening im Rahmen des Niedersächsischen Rohmilchmonitorings

im Rahmen der

Zuwendungen aus der Umlage der Milchwirtschaft in Niedersachsen nach § 22 Milch- und Fettgesetz (MFG) und gemäß der Richtlinie über die Gewährung von Zuwendungen zur Förderung von nicht investiven Maßnahmen für Forschungs- und Entwicklungsvorhaben im Milchsektor (Erl d. ML vom 26.03.2015 – 103.3-63067/10-3)

Institutionelle Förderung der Landesvereinigung der Milchwirtschaft Niedersachsen e.V.

Projektzeitraum

01.08.2018 – 21.01.2019

Projektbearbeiter:

Ulrich Szesniak
Dr. Helmut Steinkamp
Institut für Lebensmittelqualität
LUFA Nord-West
Ammerländer Heerstraße 115-117
26129 Oldenburg

Abschlussbericht

Durchführung eines Evaluationsverfahrens für ein Antibiotika/Tierarzneimittel-Multi-Screening im Rahmen des Niedersächsischen Rohmilchmonitorings

Hintergrund und Ausgangssituation

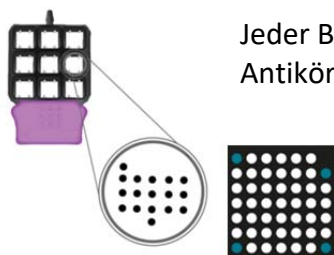
Im Rahmen der VO (EU) 37/2010 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprung sind bereits heute für eine Vielzahl von Wirkstoffen Grenzwerte für deren Höchstgehalte festgelegt und müssen zukünftig zur Gewährleistung der Rohmilchqualität auch analytisch abgebildet werden.

Im Rahmen des bestehenden Milchmonitorings werden z.Zt. einige dieser Stoffgruppen/Wirkstoffe untersucht. Dies sind aktuell die Tierarzneimittel

- Chloramphenicol * * ab 2019 Untersuchung auf Chinolone
- Tetracycline
- Streptomycin
- Makrolide

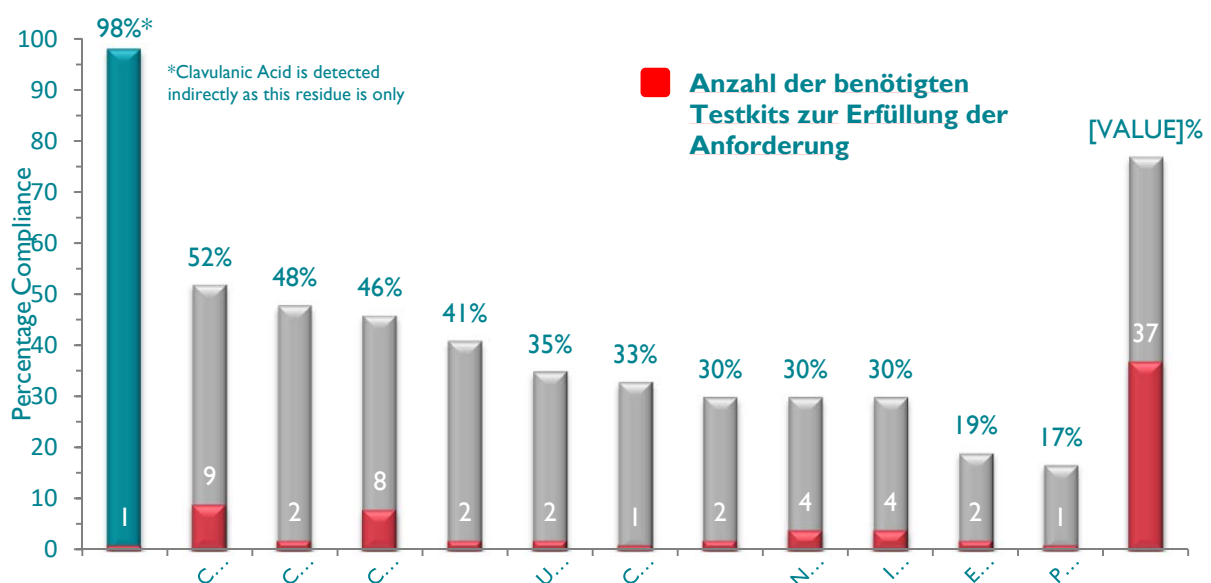
Diese Wirkstoffe werden jeweils in Einzeltests mittels ELISA bzw. RIA Verfahren gemessen. Um nach diesem System neue oder zusätzliche Wirkstoffe zu etablieren, benötigt es jeweils eine zusätzliche, separate Testdurchführung, die ggf. vor Einsatz noch validiert werden muss.

Um möglichst alle in der VO (EU) 37/2010 genannten Wirkstoffe analytisch in einem zeitlich wie finanziell überschaubaren Rahmen untersuchen zu können, soll das von der irischen Firma RANDOX entwickelten „Infiniplex Multiplex Biochip Array“ getestet werden. Das Unternehmen verspricht, 43 Stoffgruppen in einem Ansatz und mit einem Verfahren aus einer Milchprobe zu erfassen. Damit ist der größte Teil der in der Verordnung genannten Wirkstoffe analytisch abgedeckt und laut Hersteller soll das Infiniplex-System auch im Rahmen der gesetzlich geforderten Nachweisgrenzen detektieren. Somit würde eine wesentlich breitere Absicherung im bestehenden Monitoring möglich.



Jeder Biochip beinhaltet bis zu 43 Antikörper-basierte Einzeltests.

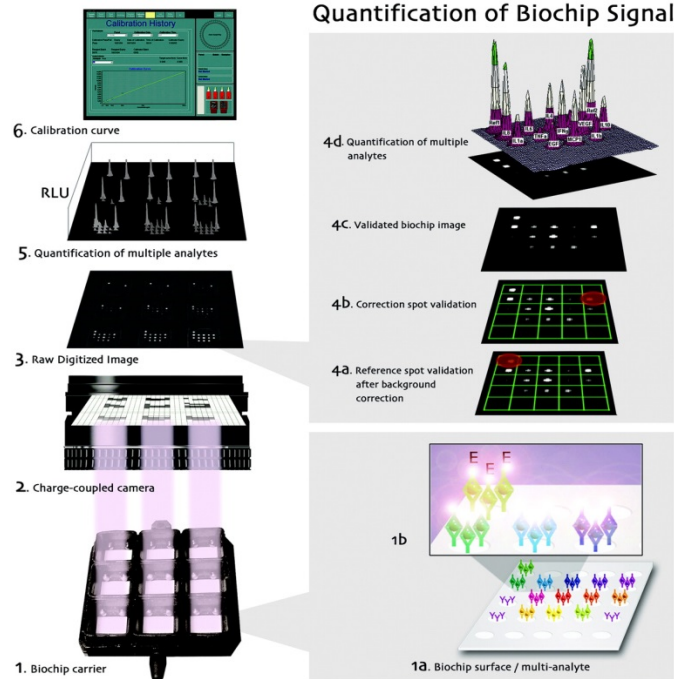
Das „Infiniplex“ Multi-Screeningsystem in jetziger Version erfüllt zu 98% die Forderungen der VO (EU) 37/2010 mit einem einzigen Testansatz, wogegen mit 37 verschiedenen derzeit verfügbaren Tests (und damit multiplen Testansätzen, Probenvorbereitungen und Mess-Systemen) , wenn überhaupt praktisch durchführbar, gerade 80% Erfüllungsquote erzielbar wären. “ (Quelle: RANDOX Food Diagnostics)



Durchgeführte Arbeiten

Die LUFA-Nord-West hat in einer ersten Evaluationsphase, als Ergänzung zum etablierten Untersuchungsumfang im Rahmen des Nordwestdeutschen Rohmilch-Monitorings, eine Feldstudie an über 400 Proben durchgeführt, um die Eignung des „Infiniplex“ Multi-Screeningsystems bezüglich Anwendbarkeit und Verlässlichkeit zu überprüfen.

Nach einer intensiven Trainings- und Schulungsphase des Laborpersonals wurden diese Proben aus den laufenden Monitoring-Abrufen der Monate Juni und Juli 2018 rekrutiert und zusammen mit diversen Vergleichs- und Verifizierungsproben parallel zum etablierten Analysenumfang auf der RANDOX „Investigator“ Mess- und Auswerteeinheit vermessen, wobei das Prinzip der Chemolumineszenz nach erfolgter konzentrationsabhängigen Umsetzung nach dem ELISA-Prinzip zum Tragen kommt: “ (Quelle: RANDOX Food Diagnostics)

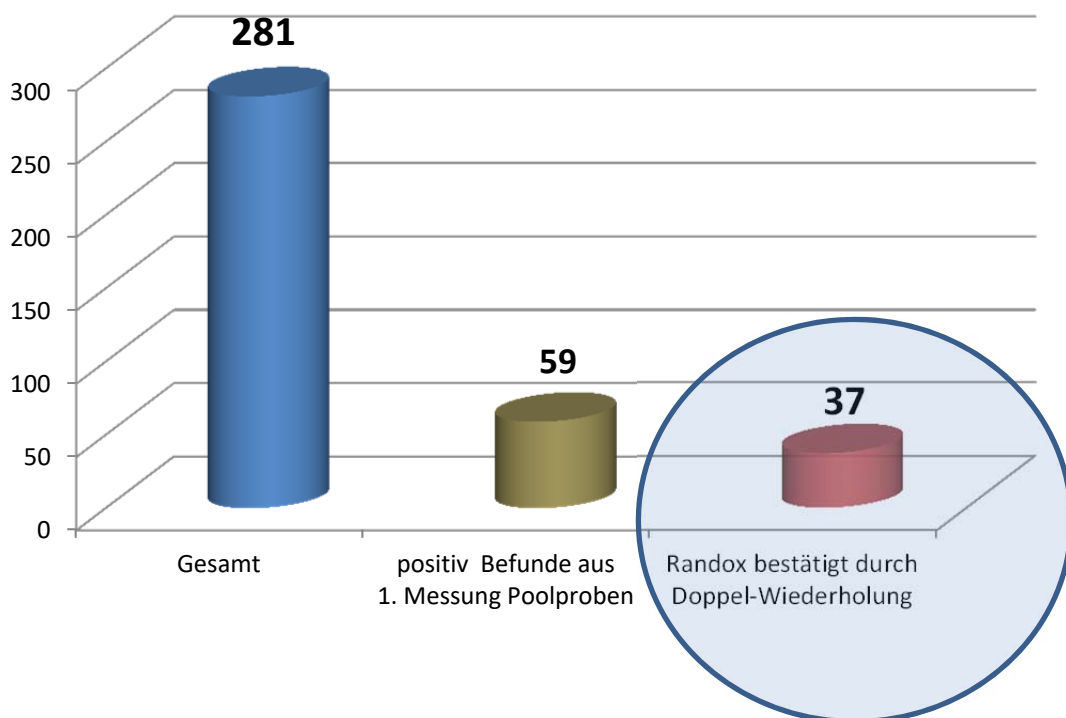
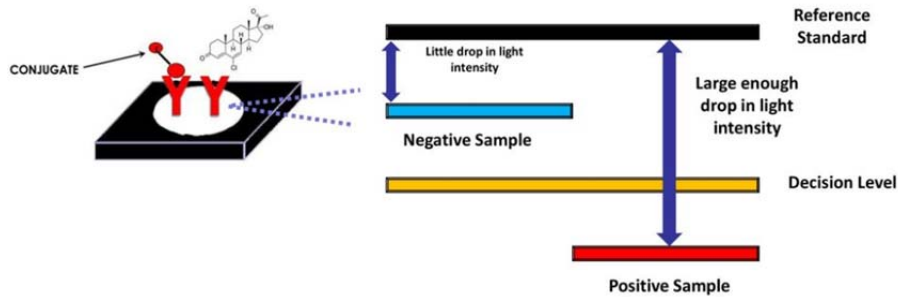


Auswertung und Ergebnisse

Set 1 Proben aus Monitoring 10er Pool)	98	} 281
Set 2 Proben aus Monitoring 10er Pool	79	
Set 3 Proben aus Monitoring 10er Pool	104	
Vergleichs- und Verifizierungsproben	139	
Mit RANDOX Infiniplex gemessene Proben gesamt :	420	

Von den 281 Poolproben wurden im Screening-Meßgang (Single-Run) zunächst 59 Proben als „Positive“ nach dem RANDOX Infiniplex Auswertalgorithmus ausgegeben, was einer Quote von ca. 20% entspricht. Der Infiniplex Verfahrensanweisung folgend müssen solche Proben zur Absicherung einem zweiten Meßgang in Doppelbestimmung unterzogen werden. Dabei verblieb ein Anteil von 60% dieser Proben, entsprechend 37 Proben absolut, als „Infiniplex-Positiv“.

Schema: Entscheidungslevel „Positiv / Negativ“ (Quelle: RANDOX Food Diagnostics)



Durch dieses Prozedere verringerte sich die Positiv-Quote auf ca. 13%, was dem Anteil an Proben entspricht, die zur endgültigen Verifizierung einer Referenzanalytik über LC-MS/MS unterzogen werden sollten.

Bei 10 dieser Proben wurde Chloramphenicol als „Positive“ detektiert. Hier zeigte auch der Routine-ELISA ein Meßsignal, das teilweise jedoch noch unterhalb der Auslösegrenze von 0,2 µg/kg lag. Diese Proben konnten mittels LC-MS/MS bestätigt werden, die Kontaminationsquelle war in allen Fällen die als Chloramphenicol-haltig bekannte Acidol-Konservierung.

Bei den verbleibenden 27 Proben erbrachte die Referenzanalytik keine eindeutigen bzw. als „Negativ“ ausgewiesene Ergebnisse. Am häufigsten fielen dabei die Stoffgruppen Beta-Laktame und Sulfonamide auf.

Hier gilt es jedoch bei näherer Betrachtung folgendes zu beachten:

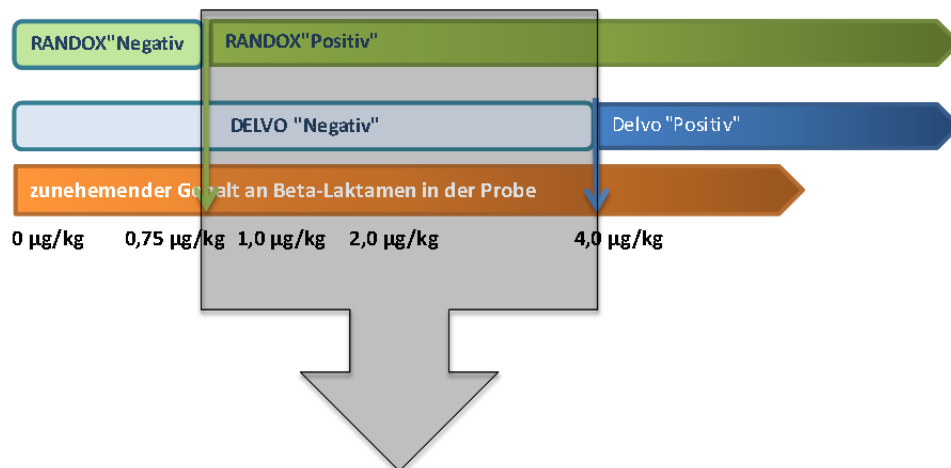
- Das Entscheidungslevel und damit die Bestimmbarkeitsgrenzen des Infiniplex Tests liegt bei vielen Wirkstoffgruppen z.T. deutlich unterhalb der Nachweis- und Bestimmbarkeitsgrenzen etablierter Testsysteme und sogar noch unterhalb denen der Referenzanalytik über das LC-MS/MS Verfahren, so dass geringfügigste Kontaminationen alternativ nicht detektierbar sind (Grauzone*),
- Die verbleibenden, als Infiniplex –Positiv“ ausgewiesenen Proben, wiesen einen signifikant hohen Anteil an bereits eingetretener Säuerung und Denaturierung auf (Proteolyse)

* Beispiel „Grauzone“ am Beispiel der Beta-Laktame

"Grauzonen" (Erfassungslücken) unterschiedlicher Testsysteme

Beta-Laktame :

Empfindlichkeit z.B. DELVO	4 µg/kg
Decisionlevel RANDOX	2 µg/kg
Lowest Positive Response RANDOX	0,75 µg/kg



"Grauzone" für Beta-Laktame

0,75 - 4 µg/kg Randox = "Positiv" / DELVO = "Negativ"

Fazit und Ausblick

- Das RANDOX-Infiniplex Verfahren ist in einem routinierten ELISA-Labor durch qualifiziertes Fachpersonal gut und sicher handhabbar, stellt jedoch auch ein extrem empfindliches und in Bezug auf die Beurteilung der Messergebnisse anspruchsvolles Messverfahren dar.
- Die ermittelte, vermeintlich hohe Positiv-Quote, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Konzentrationen der Wirkstoffe im Grenzbereich der Erfassungsgrenzen des Infiniplex Tests und damit unterhalb denen der etablierten Bestimmungsgrenzen herkömmlicher Testverfahren und sogar teilweise unterhalb denen der Referenzanalytik mittels LC-MS/MS liegen.
- Außerdem hat sich als ein möglicher erheblicher Störfaktor augenscheinlich das Alter und vor allem der Zustand (vermutlich durch Proteolyse beginnende Denaturierung) der Proben zum Zeitpunkt der Untersuchung / Messung herauskristallisiert, was einen unerwünschten Anteil an falsch-positiven Ergebnissen generiert.
- Eine wünschenswert verbesserte Screening-Tauglichkeit für Massenuntersuchungen, wie z.B. für Proben aus einem Monitoring-System, sollte in einer zweiten Projektphase evaluiert werden durch eine weiterführende Versuchsreihe, mit dem Focus auf der Rekrutierung möglichst nicht denaturiertem Probematerial durch z.B. Einfrieren der Poolproben unmittelbar nach Herstellung, um zum einen diesen Störfaktor auszuschließen und zum anderen die Positiv-Quote auf ein plausibles Maß, auch im Hinblick auf nachfolgende Einzel-Lieferanten Untersuchungen, signifikant zu reduzieren.
- Die tatsächliche Sensitivität dieses Testsystems, gerade im Vergleich zur derzeit verfügbaren Referenzanalytik, sollte ergänzend in einer Studie an Rohmilchproben von kontrolliert mit Tierarzneimitteln behandelten Kühen erfolgen, wobei in regelmäßigen Probenahmen das Ausschleichen der Mittel im zeitlichen Verlauf sowie die dabei erzielbaren Nachweisgrenzen aufgezeigt werden.
- Können die bis dato aufgefallenen Störfaktoren durch geeignete Maßnahmen ohne größeren Aufwand deutlich minimiert werden und erweist sich die angedeutete hohe Sensitivität als sicher reproduzierbar, scheint das getestete Multi-Screening System durchaus geeignet, die Aussagekraft des bisherigen Rohmilchmonitorings im Hinblick auf pharmakologisch wirksame Substanzen deutlich zu erhöhen.