



Überwachung von Antibiotika-Rückständen in Milch – Etablierung des neuen BioSensor-Systems MCR 3 für Routineuntersuchungen in der Praxis

Innovation – Netzwerk – Transparenz – Information



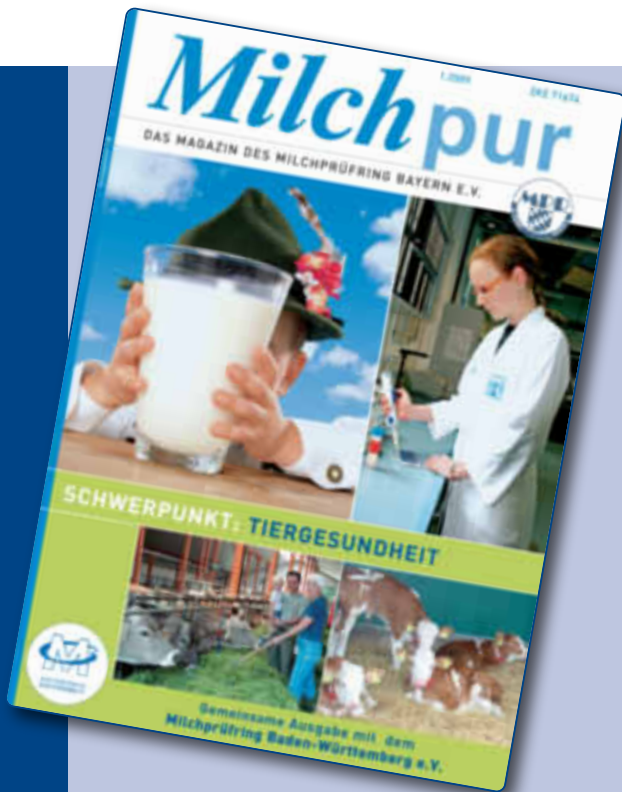


Der BioSensor MCR 3 - mehr Sicherheit für die Milch

„Hemmstoffe in der Milch?! Das ist schon seit vielen Generationen eine Schreckensmeldung für jeden Milchbauern. War es früher vor allem der wirtschaftliche Schaden, der damit verbunden war – sowohl auf Seiten der Molkerei, als auch beim Milcherzeuger – so kommt heute ein ernstes rechtliches Problem dazu:

Ein positiver Hemmstofftest in der Milch ist spätestens seit In-Kraft-Treten der EU-Lebensmittelhygieneverordnung 2006 auch ein Problem der Lebensmittelüberwachung.“ (Milchpur 01/2008)





Wenn Milch Hemmstoffe (= Antibiotika) enthält, ist sie als Lebensmittel unbrauchbar. Ein Problem in der Milchwirtschaft ist dabei, dass Milch verschiedener Herkunft entlang der Lebensmittelkette dauernd vermischt wird. Um einen Schaden durch Kontamination möglichst gering zu halten, muss belastete Milch also möglichst frühzeitig schon am Anfang der Lebensmittelkette ausgeschlossen werden. Aber wie?

Die Einhaltung der gesetzlich festgelegten Grenzwerte für verschiedene Antibiotika ließ sich bislang in der Praxis vor Ort mit den aktuell verfügbaren Testmethoden entweder aus methodischen Gründen oder aber wegen der viel zu hohen Kosten nicht sicherstellen. Wird aber später in der Kette in großen Sammel tanks eine Kontamination festgestellt, ist der wirtschaftliche Schaden hoch. Jetzt ist aber eine Lösung des Problems in Sicht!

Die Lösung heißt MCR 3!

Der Prototyp des MCR 3 (Munich Chip Reader der dritten Generation) steht mitten in Bayern im Labor des Milchprüfing Bayern e.V. in Wolnzach. Mit diesem neuen BioSensor kann im Verbund mit den aktuell verfügbaren Routinemethoden ein integriertes System zur Vermeidung von Antibiotika-Rückständen in Milch etabliert werden, das weltweit zum ersten Mal die Lebensmittelkette Milch schon frühzeitig zuverlässig und gleichzeitig kostengünstig absichert.



Der Einsatz von Antibiotika

Rückstände in Lebensmitteln sind zwar unerwünscht, aber grundsätzlich nicht vermeidbar. Dies ist Anlass für vielfältige Missverständnisse, besonders auch gegenüber Verbrauchern.

Milch und Milchprodukte sind dabei vermehrt betroffen, weil Milch als besonders gesundes und naturbelassenes Lebensmittel gesehen wird und der Gedanke an mögliche Rückstände weder zur Vorstellung der Konsumenten noch zu vielen Werbeaussagen passen will. Es besteht scheinbar ein Widerspruch. Die Anwendung von Tierarzneimitteln wie Antibiotika bei der Behandlung kranker Milchkühe ist unbestreitbar ein Gebot des Tierschutzes einerseits. Auch bei minimiertem Einsatz und der Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen ist dies untrennbar mit dem Risiko von Rückständen im Lebensmittel Milch verbunden. Andererseits hat der Verbraucher ein berechtigtes Interesse an rückstandsfreien Lebensmitteln, weil Rückstände, wie etwa die aus der Behandlung mit Antibiotika, ein Allergiepotezial besitzen, die Resistenzbildung von Keimen fördern und möglicherweise sogar einen direkten toxischen Effekt haben.



Ausgangssituation in der Lebensmittelüberwachung

Um dieser Problematik zu begegnen hat der Gesetzgeber strenge Vorschriften zur Anwendung von Antibiotika bei Tieren erlassen und gleichzeitig für mögliche Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft Maximale Rückstandshöchstmengen (MRL = maximum residue limits) festgelegt, die nicht überschritten werden dürfen.

Seit Bestehen der entsprechenden EU-Verordnung 2377/90¹ und demnach seit mehr als 20 Jahren ist klar, dass das Konzept der Festlegung von MRL-Werten in Lebensmitteln nur dann erfolgreich umgesetzt werden kann, wenn man Methoden zur Qualifizierung und Quantifizierung der einzelnen Substanzen vor Ort in der Routineüberwachung zur Verfügung hat.

Das aktuelle System für die Absicherung der Rohmilchkette beruht auf der Untersuchung der Anlieferungsmilch aus den Erzeugerbetrieben im Rahmen der Milchgüteverordnung (MilchGüV) – in Bayern durch den Milchprüfing Bayern e.V. – sowie den Eigenkontrollen der Molkereien bei der Milchannahme im Verarbeitungsbetrieb. Dort können aufgrund technischer und wirtschaftlicher Grenzen bislang nur Nachweismethoden eingesetzt werden, die keine lückenlose Überwachung der Einhaltung der MRL-Werte ermöglichen. Derartige Methoden werden heute routinemäßig nur durch die Lebensmittelüberwachung entsprechend des nationalen Rückstandskontrollplans sporadisch mit einigen hundert Proben pro Jahr angewandt.

¹ nunmehr ersetzt durch die EU-Verordnungen 470/2009 und 37/2010



Wie wird heute getestet?

Auf Ebene der Milcherzeuger wird aufgrund hoher Untersuchungszahlen das kostengünstige Screening mit mikrobiologischen Hemmstofftests (Brillantschwarz-Reduktionstest, BRT) eingesetzt. Dieses erlaubt zwar den Nachweis einer breiten Palette von „Hemmstoffen“, lässt aber im Falle einer positiven Reaktion keine Identifizierung des Rückstandes zu. Zudem ist dieses Nachweisverfahren aufgrund der relativ langen Testdauer von zwei Stunden und mehr für zeitkritische Anwendungsbereiche nicht geeignet.

Molkereien setzen zur Wareneingangskontrolle, also meist vor dem Abtanken der gesammelten Milch aus dem Milchsammelwagen, in der Regel Rezeptortests – sogenannte „Schnelltests“ – ein. Dabei liegt zwar das Testergebnis innerhalb von Minuten vor und je nach eingesetztem Test (Antikörper) werden Substanzen einer Antibiotika-Gruppe spezifisch mit definierbaren Nachweisgrenzen erfasst, jedoch werden alle anderen Antibiotika grundsätzlich nicht detektiert. Da sich der in der Praxis am häufigsten eingesetzte Test folgerichtig gegen die am häufigsten eingesetzten Antibiotika aus der Gruppe der Betalaktame richtet, bleiben Nicht-Betalaktame unentdeckt. Etwa 10% der angewandten Wirkstoffe fallen somit durch das analytische Raster in der Wareneingangskontrolle der Molkerei. Diese Lücke könnte durch die Anwendung der Standardanalysemethode mit Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie geschlossen werden. Nur damit ist es bislang möglich Antibiotika zuverlässig zu bestimmen und zu quantifizieren, was jedoch durch eine aufwendige Probenaufbereitung sehr zeit- und vor allem kostenintensiv und somit nur in speziellen Anwendungsbereichen möglich ist.



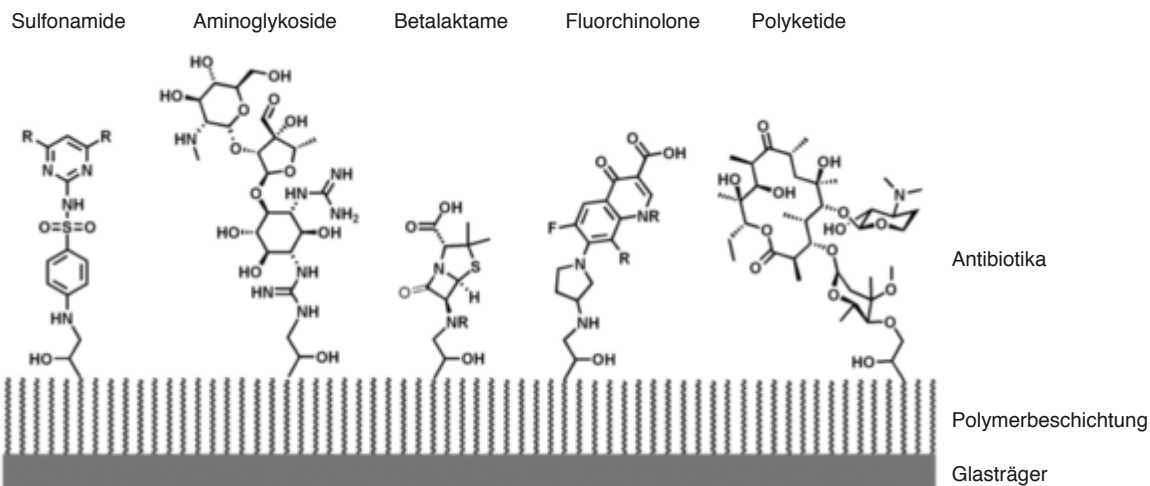


Der MCR 3 schafft neue Möglichkeiten

Zur praxisgerechten Umsetzung der lebensmittelhygienischen Anforderungen sollten Testsysteme idealerweise möglichst viele potentielle antimikrobielle Rückstände parallel und in kurzer Zeit mit einer einzigen Messung erfassen. Mit diesem Ziel vor Augen entwickelten Wissenschaftler des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der LMU München (Prof. Dr. E. Märtlbauer) und des Lehrstuhls für Analytische Chemie der TU München (Prof. Dr. R. Nießner) in zwei FEI-Forschungsprojekten ein neues BioSensor-System bis zur Prototypenstufe, das die wichtigsten in der Milchproduktion verwendeten Antibiotika parallel ohne Probenzubereitung in nur einigen Minuten direkt aus Rohmilch detektieren kann. Das Messprinzip des BioSensors MCR 3 beruht auf einer Wechselwirkung zwischen dem jeweiligen Antibiotikum und spezifischen Antikörpern. Bei den 14 aktuell detektierbaren Arzneimittel-Rückständen handelt es sich um die am häufigsten in der Veterinärmedizin angewandten Vertreter der Antibiotika²:

- Sulfonamide – Sulfamethazin (100) und Sulfadiazin (100)
- Betalaktame – Penicillin G (4), Ampicillin (4), Cloxacillin (30) und Nafcillin (30)
- Cephalosporine – Cephapirin (60) und Cefiofur (100)
- Aminoglykoside – Streptomycin (200), Neomycin B (1.500) und Gentamicin (100)
- Polyketide – Erythromycin A (40) und Tylosin (50)
- Fluorchinolone – Enrofloxacin (100)

² jeweilige MRL-Werte [in µg/L] nach EU-VO 37/2010 in Klammern

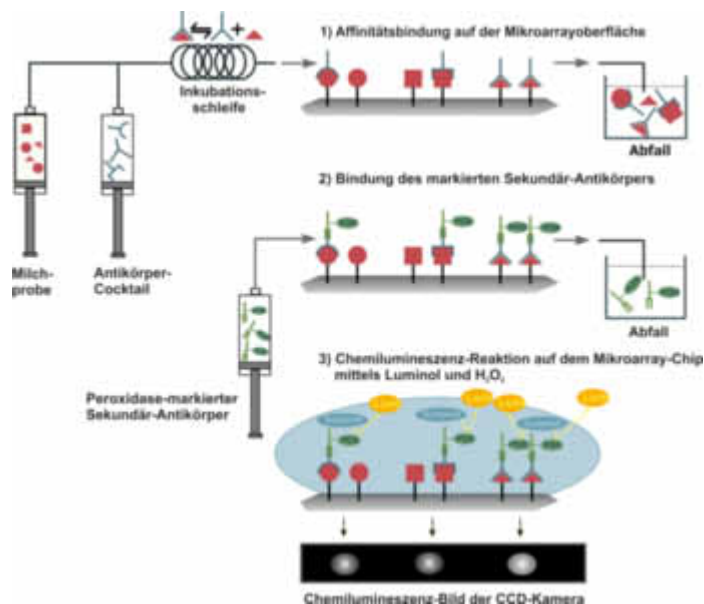


Drei Schritte bis zum Messergebnis

Der Untersuchungsablauf am MCR 3 ist dreistufig. In die zu untersuchende Milchprobe wird im ersten Schritt ein Cocktail aus den spezifisch auf diese 14 Antibiotika reagierenden Antikörpern gemischt. Ist in der Milch ein Antibiotikum vorhanden, so bindet sich der entsprechende Antikörper an das jeweilige Antibiotikum. Der nächste Reaktionsschritt passiert auf der Glasoberfläche des Mikroarray-Chips. Auf jedem Chip sind die 14 Antibiotika in kleinen Punkten (Spots) geordnet in einem Gitter (Array) aufgedruckt.

Leitet man die mit der Antikörperflüssigkeit vermischte Milchprobe über den Chip, reagieren die ungebundenen Antikörper mit den Antibiotikapunkten auf der Glasoberfläche des Chips. War schon ein Antibiotikum in der Milchprobe, dann wurde der Antikörper bereits von diesen Antibiotika-Molekülen gebunden und – je nach Konzentration des Antibiotikums in der Probe – bereits ganz oder teilweise verbraucht. Es binden also wenige oder keine Antikörper an die entsprechenden Antibiotikapunkte auf der Glasoberfläche.

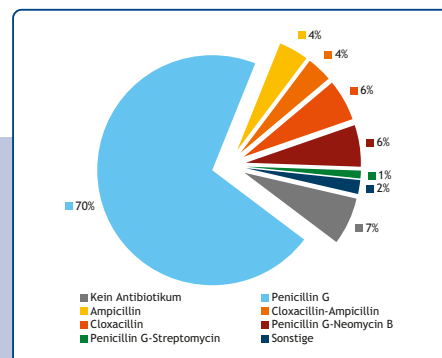
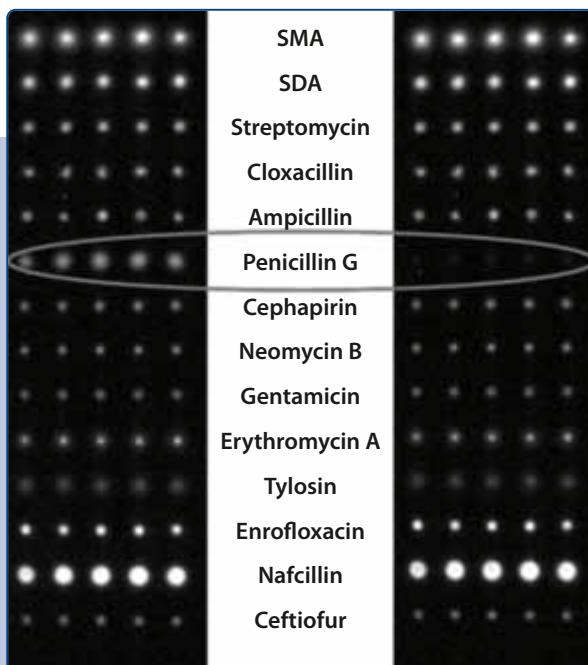
Im letzten Schritt werden die gebundenen Antikörper auf der Glasoberfläche mit einem zweiten Detektionsantikörper durch Lichtemission sichtbar und damit messbar gemacht. Durch diese chemische Lichtreaktion, wie sie im Prinzip auch in der Kriminalistik beispielsweise zum Nachweis von Blutspuren verwendet wird, leuchten danach diejenigen Punkte am hellsten auf, an denen die meisten Antikörper gebunden sind. War bereits ein Antibiotikum in der Milch, stehen weniger Antikörper zur Verfügung und der entsprechende Lichtpunkt erscheint dunkler oder ist bei einer sehr hohen Antibiotika-Konzentration überhaupt nicht mehr sichtbar. Die Leuchtintensität der Punkte des Mikroarrays wird mit einer Kamera aufgenommen und in der Auswertesoftware ermittelt und liefert so nicht nur den Nachweis, ob ein Antibiotikum in der Milchprobe enthalten ist, sondern auch wie viel davon in der Probe vorliegt.



Das Besondere am MCR 3

Jeder Antibiotika-Chip wird eigens kalibriert, das heißt es werden Standardproben nacheinander gemessen und analysiert, die alle messbaren Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen beinhalten (0-1.000 µg/L). Die genaue Auswertung erfolgt über eine Auswertesoftware, welche anhand der gemessenen Lichtintensität die Konzentration des Antibiotikums in der Milchprobe berechnet. Zur Absicherung der Untersuchung wird jedes Antibiotikum fünffach auf dem Chip untersucht. Dieser komplexe und trotzdem hoch zuverlässige Untersuchungsablauf dauert nur etwa sechs Minuten. Nach der Analyse wird der Chip nicht weggeworfen, sondern er kann bis zu 100-mal regeneriert werden. Da der MCR 3 nicht nur bestätigt, dass Hemmstoffe in der Milchprobe sind, sondern genau feststellt, welche Substanz in welcher Konzentration vorliegt, wird die Ursachenforschung nach der Kontaminationsquelle sehr effektiv unterstützt, in vielen Fällen sogar erst möglich. Dies nützen die Mitarbeiter der Molkereien und des Milchprüfing Bayern e.V. sowie auch die Amtstierärzte sehr gerne für Ihre Aufklärungs- und Beratungstätigkeit. Anhand bestimmter gefundener Antibiotika-Kombinationen kann man unter Umständen auch Rückschlüsse auf das verwendete Medikament ziehen.

Beim Milchprüfing Bayern e.V. sind bislang über 3.000 Hemmstoff-positive Milchproben am MCR 3 gemessen und ausgewertet worden. Die gefundenen Ergebnisse lassen zusammen mit den gemachten Erfahrungen erwarten, dass durch den Praxiseinsatz des MCR 3 ein deutlicher Fortschritt bei der Absicherung der Lebensmittelkette Milch erreicht werden kann.



Neu und bahnbrechend ist, dass mit dem MCR 3 parallel und schnell ohne Probenvorbereitung eine Vielzahl von Antibiotika gleichzeitig identifiziert und quantifiziert werden können, und zwar unter praxisrelevanten wirtschaftlichen Bedingungen.

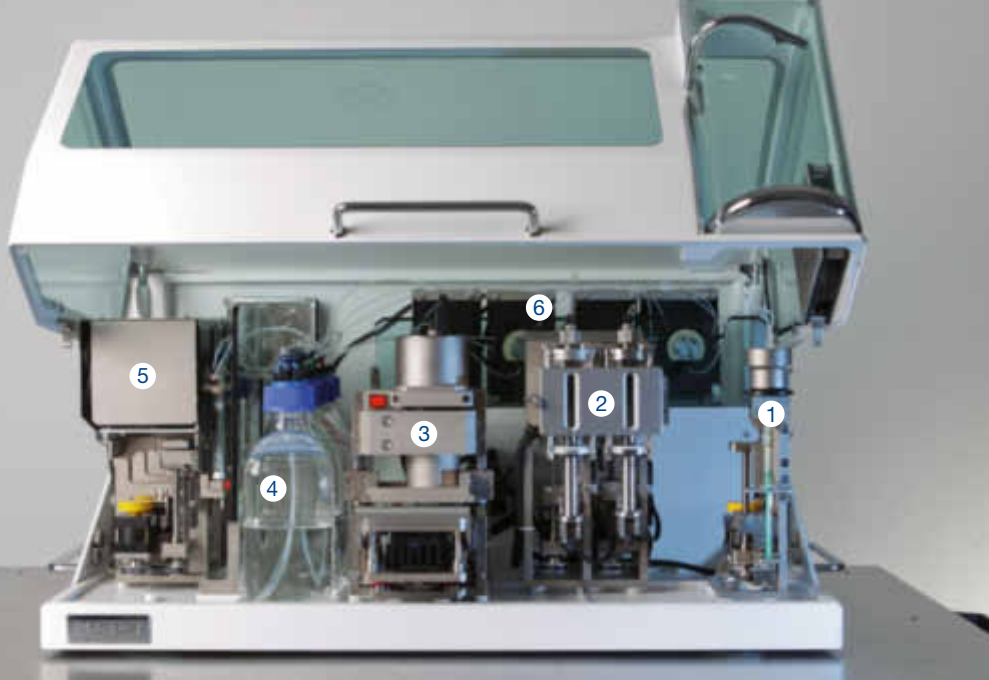


Neue Dimension in der Lebensmittelsicherheit

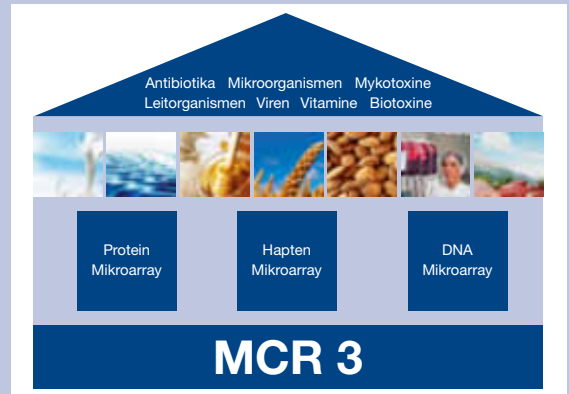
Der MCR 3 hat beim Milchprüfing Bayern e.V. die grundlegende Validierungsphase positiv absolviert und geht nunmehr seinem ersten Praxiseinsatz in der bayerischen Milchwirtschaft entgegen.

Möglich wurde dies durch einen hohen Anteil öffentlicher Fördermittel des Bundes (FEI/BMWi) und des Landes Bayern (StMELF) in der Entwicklungs- und Validierungsphase. Aktuell laufen die Bemühungen, die weitere Entwicklung des MCR 3 bis hin zur Anwendungs- und Marktreife voran zu treiben. Die Firma R-Biopharm AG (Darmstadt) und der Gerätehersteller GWK Präzisionstechnik GmbH (München) arbeiten zusammen mit dem Konsortium der Entwickler, dem Milchprüfing Bayern e.V. sowie seiner Tochterfirma AiM GmbH (München) daran, den MCR 3 weiter zu optimieren und für die Praxis fit und auch zu vertretbaren Kosten verfügbar zu machen.





- 1 Probenaufnahme
- 2 Antikörperspritzen
- 3 Chip-Kamera-Einheit
- 4 Reagenzienreservoirs
- 5 Spritzenpumpen
- 6 Ventil-Einheit



Mit dem MCR 3 sind nunmehr in Bayern alle Elemente vorhanden, um zusammen mit den Projektbeteiligten ein echtes Kompetenzzentrum rund um das Thema „Antibiotikarückstände in Milch“ zu etablieren. Das Clusterprojekt „Überwachung von antimikrobiellen Rückständen in Milch – Etablierung des neuen BioSensor-Systems MCR 3 für Routineuntersuchungen in der Praxis“ hat dazu einen bedeutenden Beitrag geleistet. Dies ist ein weiterer Schritt für die bayerische Milchwirtschaft als Qualitätsführer hinsichtlich der Rückstandsfreiheit und der Sicherheit ihrer Produkte!

Über die Bestimmung von Antibiotika in Milch hinaus kann das Testspektrum des MCR 3 um eine Vielzahl weiterer Substanzgruppen und auch um weitere Matrices erweitert werden. So ist denkbar den Nachweis weiterer Pharmazeutika, aber auch von Toxinen, Hormonen, Viren, Pestiziden, pathogenen Bakterien und weiterer Analyten auf der MCR 3-Plattform zu etablieren. Neben der Rückstandsüberwachung von Milch könnte der MCR 3 auch für Trink-, Prozess- bzw. Abwasser und weitere Lebensmittel wie etwa Fleisch, Honig oder Eier weiter entwickelt werden. Einige Projekte dazu laufen bereits vielversprechend in Kooperation von TU München und LMU München.

Kooperationspartner:



Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Prof. Dr. Erwin Märtlbauer



Lehrstuhl für Analytische Chemie
Prof. Dr. Reinhard Nießner



Milchprüfung Bayern e.V.

Hochstatt 2
85283 Wolnzach

Tel. +49 8442 95 99-0
Fax +49 8442 95 99-250

mcr3@mpr-bayern.de
www.mpr-bayern.de

© Juni 2011. Nachdruck und/oder Verwendung des Inhalts nur unter Quellenangabe gestattet.

mp