

Entwicklung eines schnellen Biosensorarrays zur online-Bestimmung antimikrobiell wirksamer Verbindungen in Rohmilch

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. Dr. E. Märtlbauer/Dr. R. Dietrich
Forschungsstelle II:	Technische Universität München Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie Prof. Dr. R. Niessner/Dr. M. Seidel
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V., Berlin
	Projektkoordinator: Dr. T. Winkelmann Frischli Milchwerke GmbH, Rehburg-Loccum
Laufzeit:	2006 – 2008
Zuwendungssumme:	€ 473.150,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

In der Prophylaxe und Therapie von (Euter-)Infektionen bei Milchkühen spielen Antibiotika und Sulfonamide eine wichtige Rolle. Trotz gesetzlicher Vorschriften (EU-Verordnung 2377/90) und Überwachungsmethoden kommt es immer wieder zu Rückständen antimikrobieller Substanzen in Milch, die hohe wirtschaftliche Verluste in der Milch- und Lebensmittelindustrie nach sich ziehen und ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darstellen. Neben den amtlichen Untersuchungen sind Eigenkontrollen verpflichtend vorgeschrieben, die die Einhaltung von MRLs sicherstellen. Die bislang etablierten mikrobiologischen Nachweisverfahren sind zeitaufwendig und erlauben eine Parallelmessung verschiedener Präparate nur in sehr beschränktem Maße.

Ziel des Forschungsvorhabens waren Aufbau und Untersuchung eines Biosensorsystems zum Vor-Ort-Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch. Dies erforderte sowohl Neuentwicklungen auf der biologisch-chemischen Seite als auch grundlegende konstruktive Neuerungen am Messgerät. Es wurden im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt, die zum einen auf eine wirtschaftlich akzeptable Testzeit

hinwirken, zum anderen eine für die Milchwirtschaft kostengünstige und praktikable Lösung vorsehen.

Forschungsergebnis:

Im Bereich der Neuentwicklung von monoklonalen Antikörpern (mAk) zum Nachweis von Antibiotika, wie den Fluorchinolonen, Tetracyclinen und Penicillinen, konnten erhebliche Fortschritte erzielt werden. Sowohl für die Fluorchinolone als auch für die Tetracycline wurden generische mAk generiert und etabliert, die die Detektion aller beim Nutztier eingesetzten Substanzen erlauben. Im Bereich der Penicillin-Gruppe konnte ein mAk etabliert werden, der die diagnostische Lücke, die bei der Detektion von Nafcillin bestand, schließt. Neben der Verbesserung der Oberflächenchemie der Chips konnten auch bei der für das Auslesen der Ergebnisse notwendigen Markierung der Antikörper Verbesserungen zum herkömmlichen System erzielt werden.

Im Bereich der Chipherstellung gelang unter Einsatz eines neu angeschafften Spottersystems die reproduzierbare Herstellung qualitativ hochwertiger Chips, die sich zudem durch eine hohe

Regenerierbarkeit auszeichneten. Ebenso gelang die Konstruktion einer softwaregesteuerten, mobilen Mikroarray-Ausleseplattform MCR 3 (Microarray Chip Reader 3). Für das Auslesen der Daten konnte eine neue Auswertesoftware konzipiert werden. Das fertige System erlaubt die Parallelmessung von 13 antimikrobiell wirksamen Substanzen innerhalb von 5,5 min. Im Rahmen eines Praxistests wurde zudem die Tauglichkeit des Systems für die Messungen von Realproben demonstriert. Die erzielten Ergebnisse zeigten eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit den Resultaten aus den mikrobiologischen Hemmstofftests. Der Praxistest wurde im Labor des Milchprüfing Bayern e. V. (MPR Wolnzach) durchgeführt. Durch die neuartige Konzeption regenerierbarer Biochips in Verbindung mit der Fertigung des Multianalyt-Messgerätes konnte ein kostengünstiges, wirtschaftliches und in seinem weiteren Einsatz flexibel ausbaubares System für die Milchindustrie realisiert werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Primäre Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse ergeben sich zunächst für den Bereich der Milchindustrie - der stärksten Branche innerhalb der Ernährungsindustrie. Hinzu kommen ca. 120.000 milcherzeugende Betriebe in Deutschland, die etwa 28 Mio. t Kuhmilch produzieren. Für die Untersuchung auf Hemmstoffe werden derzeit mikrobiologische und Rezeptor-Schnelltests eingesetzt; durch seine kurzen Testzeiten und dem breiten Nachweisspektrum hebt sich das neue Sensor-System von den herkömmlichen Methoden ab. Aufgrund des schnellen simultanen Nachweises von Antiinfektiva in Milch können Produktionsausfälle nahezu vollständig vermieden werden sowie Folgekosten, wie Entsorgung, Reinigung oder Schadenersatz, drastisch verringert werden, was sowohl für milcherzeugende als auch für milchverarbeitende Betriebe von beträchtlicher wirtschaftlicher Bedeutung ist. Somit leisten die im Vorhaben erzielten Ergebnisse in vielerlei Hinsicht einen Beitrag zur Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit kleiner und mittlerer Unternehmen.

Zudem zeigt ein Nachfolgeprojekt, das in Kooperation mit der Milchindustrie zur weitergehenden Validierung bereits initiiert wurde, die Praxisrelevanz des Systems. Die Verwertbarkeit der Ergebnisse zeigt sich auch dadurch, dass nach Abschluss des Projektes der Bau und die Optimierung weiterer MCR-3-Geräte vorange-

trieben wird. Für eine Verbreitung des entwickelten Gesamtsystems (Biochip und Messplattform) werden nach einem erfolgreichen Abschluss des Evaluierungsprojektes beste Marktchancen gesehen.

Aus den erzielten Ergebnissen lassen sich auch weitere Nutzenanwendungen ableiten, die über die Analyse von Milch hinausgehen. Vorstellbar wären zum Beispiel der Einsatz in Schlachthöfen für die Untersuchung von Fleischsaft, Organen oder Urin von Schlachttieren oder auch anderer Lebensmittel, wie Honig oder Meeresprodukte (Fisch, Schrimps, Muscheln), auf Antibiotikarückstände. Eine Vielzahl weiterer Anwendungen, z.B. in der Medizin oder Lebensmittelüberwachung, kann sich aus dem hier beschriebenen Biosensorsystem ergeben und die entsprechenden Anwender in die Lage versetzen, kostengünstig und schnell Untersuchungsergebnisse zu liefern.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2009.
2. Baumgartner, C., Kloth, K. und Kreis, B.: Antibiotika-Rückstände in der Anlieferungsmilch sicher erkennen. *dmz* 14, 23-27 (2010).
3. Marsch, U.: Minilabor weist Antibiotikarückstände in Milch nach – Höhere Sicherheit für das Lebensmittel Milch. idw-online.de/pages/de/news368195 (2010).
4. Kloth, K., Niessner, R. und Seidel, M.: Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2106-2112 (2009).
5. Kloth, K., Rye-Johnsen, M. Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R. und Seidel, M.: A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst* 134, 1433-1439 (2009).
6. Nießner, R.: Biosensoren und ihr Potentiale für die Lebensmittelindustrie. Tagungsband 65. FEI-Jahrestagung 2007, 45-54 (2008).
7. Nießner, R.: Biosensoren und ihre Potenziale für die Lebensmittelindustrie. *DMZ* 9, 30-33 (2008).
8. Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Kloth, K., Seidel, M. und Niessner, R.: MCR 3 - die erste vollautomatische Mikroarray-Plattform zum schnellen, parallelen Nachweis von Antibiotika in Rohmilch. *Der Lebensmittelbrief* 6, 341-344 (2008).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Schönleutner Str. 8, 85764 Oberschleißheim
Tel.: 089-2180-78601, Fax: 089-2180-78602
E-Mail:
E.Maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Technische Universität München
Institut für Wasserchemie und Chemische
Balneologie
Marchioninistraße 17, 81377 München
Tel.: 089-2180-78 231, Fax: 089-2180-78 255
E-Mail: Reinhard.Niessner@ch.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

