



## Kurzform des Abschlussberichts zum Forschungsprojekt

### **"Identifizierung und Quantifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch: Evaluierung eines Biosensorsystems für Routineuntersuchungen in der Praxis und Entwicklung von Referenzverfahren"**

In dieser wissenschaftlichen Studie sollte geprüft werden, inwieweit das weiterentwickelte Biosensorarraysystem MCR 3 zur Identifizierung und Quantifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch unter Routinebedingungen geeignet ist. Hierzu erfolgte zunächst eine analytische Charakterisierung und Validierung des Messsystems, danach die Optimierung im Hinblick auf die praktische Anwendung in einem Routinelabor.

Der Schwerpunkt der an der **Forschungstelle 1 (Ludwig-Maximilians-Universität, LMU, München)** durchgeführten Untersuchungen lag in der Bereitstellung der bereits auf dem Biochip etablierten monoklonalen Antikörper (MAk) gegen Ampicillin, Cloxacillin, Nafcillin, Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Norfloxacin, sowie in der Neuentwicklung von MAk gegen weitere Antibiotika. Da die zu Beginn des Projektes auf dem Biochip etablierten Nachweise zum Teil auf kommerziell verfügbaren Antikörpern beruhten, wurde mit dem Ziel eine autarke Versorgung mit diesen Immunreagenzien sicherzustellen, die Neuentwicklung von MAk gegen Penicillin G, Ceftiofur, Cephapirin, Neomycin, Gentamicin, Tylosin Erythromycin und Tetracyclin in Angriff genommen. Dies bedeutete eine im Vergleich zu den ursprünglich im Forschungsantrag definierten Aufgaben beträchtliche Erweiterung der Forschungsarbeiten.

Im Hinblick auf die Neuentwicklung von Antikörpern wurden zum einen verschiedene Immunogene und zum anderen markierte Antigene (Coating-Antigene) zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufes hergestellt. Letztere werden für die Etablierung und Optimierung indirekter Enzymimmuntests zur Beschichtung der Festphasen (Mikrotiterplatte) benötigt. Insgesamt wurden unter Verwendung einer ganzen Reihe von Kopplungsverfahren mehr als 30 Proteinkonjugate von elf verschiedenen Zielantigenen synthetisiert. Mit ausgewählten

Proteinkonjugaten der Zielantibiotika Penicillin, Ampicillin, Ceftiofur, Cephapirin, Gentamycin, Neomycin, Tylosin, Erythromycin und Tetracyclin wurden insgesamt 85 Mäuse immunisiert, in 20 Zellfusionsexperimenten konnten insgesamt 18 stabile Hybridomzelllinien etabliert werden.

Zur Herstellung eines **Penicillin**-Immunogens wurden verschiedene Modifikationen gängiger Kopplungsverfahren überprüft. Mit den resultierenden Protein-Konjugaten wurden insgesamt 20 Mäuse immunisiert. Unabhängig vom eingesetzten Immunogen konnten jedoch bei allen Mäusen keine deutlichen Titer an Penicillin-spezifischen Antikörpern induziert werden. Orientierende Zellfusionsexperimente zeigten, dass mit den resultierenden MAKs Penicillin G nicht im gewünschten Konzentrationsbereich nachzuweisen war, die Nachweisgrenzen lagen im Bereich von 320 bis 380 µg/L (MRL 4 µg/L). Im Gegensatz hierzu ließen sich mit analogen **Ampicillin**-Proteinkonjugaten spezifische und hochaffine Antikörper in Mäusen induzieren, die Nachweisgrenze des sensitivsten Serums lag bei 1,4 µg/L (MRL 4 µg/L). Teilweise zeigten die Seren auch eine deutliche Kreuzreaktivität mit Penicillin G. Aus Zeitgründen konnte dieser Ansatz im Rahmen des Projektes allerdings nicht weiterverfolgt werden. Zum Nachweis von Cephalosporinen wurden neue Nachweisantikörper entwickelt. Unter Verwendung eines Strukturanalogs konnten vier hochaffine MAk zum Nachweis des Cephalosporin-Antibiotikums **Ceftiofur** etabliert werden. Alle MAk ermöglichen den sensitiven Nachweis von Ceftiofur weit unterhalb des MRL-Wertes von 100 µg/L, aufgrund der hohen Kreuzreaktion mit dem neben Ceftiofur als Markerrückstand im MRL definierten Desfuroylceftiofur von 34,9% wurde für den Einsatz auf dem Biosensor der MAk 2H6 ausgewählt. Dieser MAk weist zudem deutliche Kreuzreaktionen mit Cefquinom auf, einem weiteren zur Behandlung von laktierenden Rindern eingesetzten Antibiotikum. Auch zum Nachweis von **Cephapirin** wurde ein neuer MAk entwickelt, der die zuverlässige Detektion des Antibiotikums auf MRL-Niveau (60 µg/L) ermöglicht. Der Test ist hochspezifisch, der MAk weist keine relevanten Kreuzreaktionen mit anderen Cephalosporinen auf. Neue MAk wurden zudem für Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside etabliert. Mit allen drei MAks gegen **Neomycin** können Rückstände im unteren ppb-Bereich detektiert werden, ähnliches gilt auch für die neu entwickelten MAks gegen **Gentamicin**. Geeignete Antikörper wurden in den Biosensor integriert. Des Weiteren wurden vier MAks zum Nachweis des Makrolid-Antibiotikums **Tylosin** entwickelt, die zum Teil ausgeprägte Kreuzreaktionen mit dem strukturverwandten Tilmicosin aufwiesen. Alle MAk waren in der Lage, Tylosin auf MRL-Niveau (50 µg/kg) nachzuweisen, Probleme beim Einsatz im Biosensor bei der

Untersuchung fettreicher Milch konnten durch die Verwendung eines alternativen Klons beseitigt werden. Versuche zur Neuentwicklung von MAk gegen **Erythromycin** und **Tetracyclin** scheiterten hingegen, bei beiden Antibiotika konnten mit den eingesetzten Proteinkonjugaten keine substanzspezifischen Antikörper bei Mäusen induziert werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick zu den neu entwickelten und letztlich im Biosensor integrierten MAks.

Für die Behandlung von laktierenden Rindern sind derzeit lt. EU-Gesetzgebung 43 antimikrobielle Wirkstoffe zugelassen, in Deutschland sind davon derzeit 33 Wirkstoffe im Handel. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden und im Biosensor getesteten MAk können davon 21 Wirkstoffe (19 davon werden derzeit als Therapeutika eingesetzt) nachgewiesen werden. Analytische Lücken existieren noch bei einigen Cephalosporinen (Cefalexin, Cefazolin, Cefoperazon), Aminoglycosiden (Kanamycin, Spectinomycin), den Tetracyclinen, Lincosamiden, Polypeptid-Antibiotika und dem Makrolid Spiramycin. Während letztere nur sporadisch bei der Behandlung von Milchkühen eingesetzt werden und z.T. auch nur einige Präparate einzelner Hersteller (meist auch nur in Kombination mit anderen Wirkstoffen) zur Verfügung stehen, könnte die fehlende Nachweisbarkeit der Wirkstoffe aus der Gruppe der Cephalosporine bei potentiellen Anwendern zu Irritationen führen.

**Tabelle 1:** *Im Rahmen des Projektes neu entwickelte und in den MCR3 integrierte monoklonale Antikörper zum Nachweis von Antibiotika*

<b>MAk</b>	<b>Nachweis von</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Nachweisgrenze (µg/L)</b>	<b>Relevante Kreuz- reaktionen mit</b>
2H6	Ceftiofur	IgG <sub>1</sub>	1,1	Cefquinom (21,9%)
2F10	Cephapirin	IgG <sub>2a</sub>	16,5	----
3D7	Neomycin	IgG <sub>1</sub>	0,26	----
3E7	Gentamicin	IgG <sub>2a</sub>	0,52	----
2E8	Tylosin	IgG <sub>1</sub>	6,6	Tilmicosin (12,8%)

Der Schwerpunkt der Arbeiten an **Forschungstelle 2 (Technische Universität, TU, München)** lag darin, die Herstellungsmethode der Antibiotika-Chips hinsichtlich Standardisierbarkeit und Fertigbarkeit in Kleinserie zu evaluieren und die Qualität der

Antibiotika-Chips mittels MCR 3 zu charakterisieren. Der Antibiotika-Chip bestehend aus immobilisierten Antibiotika für Sulfamethazin, Sulfadiazin, Streptomycin, Cloxacillin, Ampicillin, Penicillin G, Cephaprin, Neomycin, Gentamicin, Erythromycin, Tylosin, Enrofloxacin, Nafcillin, Ceftiofur und Tetracyclin auf einem beschichteten Glasträger und einer Durchflussmesszelle für Chemilumineszenz-Auslesung am MCR 3 wurde bei der TUM in Vorgängerprojekten entwickelt (DFG und AIF). Eine weitere Aufgabe der TUM bestand darin, auf dem MCR 3 für den MPR eine Standardisierung des Testablaufs zu ermöglichen. Dies konnte nur erreicht werden, in dem über ein Projekt der TUM mit der GWK Präzisionstechnik, das über die Bayerische Forschungstiftung finanziert wurde, eine Auswertesoftware für CL-Mikroarray-Bilder entwickelt wurde. Die Testung der Software auf Routinetauglichkeit erfolgte beim MPR im Rahmen des Evaluierungsprojektes des BayStMelf.

Alle Projektziele wurden erfolgreich erreicht. Die jeweiligen Chemilumineszenz-Mikroarraybilder wurden beim MPR und bei der TUM mit dem MCR 3 erstellt. Mit der neuen Auswertesoftware konnten aus den Mikroarray-Bildern Daten bezüglich der Chip-Reproduzierbarkeit, Kalibrierkurven bzgl. der 14 Antibiotika, so wie Konzentrationsangaben je Milchprobe sehr einfach erfasst und ausgewertet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Auswertesoftware im Routinebetrieb generell einsetzbar ist.

Die TUM konnte des Weiteren zeigen, dass Antibiotika-Mikroarray-Chips unter standardisierten Laborbedingungen in Kleinserie hergestellt werden können. Mit dieser Standard-Prozedur können monatlich pro Person und Arbeitsplatz bis zu 300 Antibiotika-Mikroarrays hergestellt werden. Dazu müsste die Chargengröße von 40 auf 80 erhöht werden und jede Woche 80 Chips gespottet werden. Da der MPR jeden Tag Messungen an einem Chip durchführte, wurden im Projekt pro Woche 8 Chips gespottet und davon 5 an den MPR versendet.

Ein Chip pro Woche wurde bei der TUM mit dem MCR charakterisiert. Die Inter-Spotvarianzen lagen für die meisten Antibiotika bei unter 15% und die Inter-Chipvarianz bei unter 50%, wenn die Chips gleich nach der Herstellung am MCR 3 eingesetzt werden.

Zum Versand an den MPR wurden die Chips mit konservierter AIM-Standardmilch (3,5% Fett, 0,05% Natriumazid) befüllt, anschließend verpackt und gekühlt per Post verschickt. Der MPR führte jeden Werktag Messungen am MCR 3 mit einem neuen Chip durch. Die Inter-Spotvarianz lag für die meisten Antibiotika bei unter 25% und die Inter-Chip-Varianz bei unter 80%. Die Validierungsmessungen beim MPR zeigten, dass die hohen Varianzen der CL-Signale für jeden einzelnen Mikroarray-Chip zwar zu Unterschieden bei den zu

bestimmenden Arbeitsbereichen jedes einzelnen Antibiotikums führten, dies aber nicht zu einer Beeinträchtigung der Wiederfindungen führte. Grund dafür ist, dass jeder einzelne Antibiotika-Mikroarray-Chip mit dem MCR 3 kalibriert wird, bevor Realproben gemessen werden. Hierdurch werden die Messdaten pro Antibiotika-Mikroarray-Chip sehr robust, wie es der MPR mit seinen Messdaten in diesem Projekt bestätigen konnte. Nachteilig ist aktuell, dass die Kalibrierung über 6 Konzentrationsdekaden an Antibiotika-Standards erfolgen muss, damit die Arbeitsbereiche für jeden Chip immer vollständig erfasst werden können. Aus diesem Grund ist eine Minimierung der Inter-Chipvarianz auf alle Fälle ratsam. Die Kalibrierzeiten und –kosten könnten damit stark reduziert werden. Für ein kommerzielles Produkt müssen die Herstellbedingungen (Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Reinraumklasse) noch stärker reguliert werden. Die Befüllung der Antibiotika-Mikroarray-Chips mit konservierter Milch stabilisierte die immobilisierten Antibiotika, so dass die Chips über mehrere Wochen gekühlt gelagert werden können. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Wahl der Antikörper und die Konfektionierung der Antikörper-Cocktails einen starken Einfluss auf die Qualität der Antibiotika-Mikroarrays haben. Neu hergestellte Antikörper wie der Anti-Gentamicin-Antikörper von der LMU führten zu höheren Reproduzierbarkeiten zwischen den jeweiligen Chips.

Im Gesamt-Konzept des Projektes war es die Aufgabe der **Forschungsstelle 3 (muva, Kempten)** die instrumentelle Analytik als Referenzanalytik aufzubauen, um positive Befunde abzusichern und ggf. Schwächen bei der Erfassung durch das Sensorsystem zu auszugleichen. Da bei gerichtlichen Auseinandersetzungen in der Regel nur massenspektrometrisch abgesicherte Befunde gewertet werden, wurden an den LC-MS-MS-Geräten der MUVA massenspektrometrische Nachweismethoden für bestimmte Tierarzneimittel-Wirkstoffe und Wirkstoffgruppen im Zuge des Projekts entwickelt. Teilweise wurden hierfür bereits etablierte Testsysteme/Wirkstoffmethoden für verschiedene Gruppen an Tierarzneimitteln an Hochdruckflüssigchromatographen mit konventionellen Detektoren (UV, Fluoreszenz) auf die LC-MS-Geräte transferiert.

Die Validierung der Verfahren erfolgte gemäß der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG anhand der Qualitätsparameter Wiederholbarkeit  $SD_R$ , laborinterner Reproduzierbarkeit  $SD_{WIR}$  und Wiederfindung WDF. Alle Parameter wurden für Proben dotiert mit Konzentrationen, die dem 0,5-, 1- und 1,5-fachen des MRLs entsprechen mit einem 6fach-Ansatz je Konzentrationsniveau ermittelt. Die zu erreichenden Richtigkeiten und Präzisionen sind

vorgeschrieben. Darüber hinaus wurden Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der LC-MS-MS Verfahren bestimmt. Zum massenspektrometrischen Nachweis müssen mindestens 2 Massenübergänge und 5 Identifizierungspunkte herangezogen werden.

Beim Nachweis der jeweiligen Antibiotika-Gruppen wurden folgende Ergebnisse erzielt. Für Makrolide liegen die Nachweisgrenzen mit 2 bis 15 µg/kg je nach Substanz deutlich unter den festgelegten MRL-Werten (zwischen 50 und 200 µg/kg). Die Wiederfindungsraten aller Substanzen liegen zwischen 82 und 120%. Die für den Nachweis von Aminoglycosid-Antibiotika entwickelte Methode ist in der Lage, Aminoglycosid-Rückstände in Milch bis zu einer unteren Grenze von ca. 0,25 bis 4,90 µg/kg (je nach Substanz) zuverlässig zu quali- und quantifizieren. Die Wiederfindungsraten aller Aminoglycoside liegen zwischen 97 und 104%, Wiederfindungsverluste wurden hierbei durch eine Matrixkalibrierung kompensiert. Beim Nachweis der β-Lactam-Antibiotika konnten nach Modifikation der Messbedingungen alle relevanten Substanzen (Penicilline und Cephalosporine) mit ausreichender Signalintensität parallel erfasst werden. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,1 und 4,8 µg/kg je nach Substanz, die Wiederfindungsraten betragen zwischen 60 und 112 %.

Die Referenzanalytik mit LC-MS-MS stellt durch ihre Nachweisstärke sowohl in niedrigen wie hohen Gehaltsbereich zur Absicherung und Ergänzung sowohl quantitativ wie qualitativ einen unverzichtbaren Baustein des Gesamtsystems dar. Insgesamt betrachtet wurden damit die Ziele des Projektes hinsichtlich der referenzanalytischen Absicherung erreicht und zusammen mit dem Biosensor ein einzigartiges System geschaffen, das einen sicheren Nachweis von Tierarzneimittel-Rückständen in Rohmilch ermöglicht.

In **Forschungsstelle 4 (Milchprüfing Bayern e.V., MPR, Wolnzach)** wurde der MCR 3 auf seine analytischen Eigenschaften bzw. auf seine Praxistauglichkeit hin überprüft. Neben der Ermittlung der Leistungsfähigkeit und der Robustheit des MCR 3 wurde eine umfassende Untersuchung hemmstoffpositiver und -negativer Realproben sowie ein Methodenvergleich (MCR 3-BRT-Rezeptor-Referenz) durchgeführt. Gemessen wurde an dem Einzelgerät MCR 3a, welches seit Oktober 2008 beim MPR im Einsatz ist. Ein direkter Vergleich des MCR 3a mit dem zugesagten verbesserten Prototyp MCR 3b steht aufgrund der bislang nicht erfolgten Gerätebereitstellung noch aus, die entsprechenden Arbeiten wurden aber Ende Juni 2011 begonnen. Im Laufe des Projektes wurden ca. 3000 hemmstoff-positive Milchproben mit dem MCR 3 analysiert. Es wurden Rückstände an einzelnen Antibiotika wie Penicillin G,

Cloxacillin oder Ampicillin gefunden, aber auch Mischpräparate wie Penicillin G/Neomycin B, Cloxacillin/Ampicillin oder Penicillin G/Streptomycin. Das  $\beta$ -Lactam Antibiotikum Penicillin G war hierbei mit 71% das am häufigsten nachweisbare Antibiotikum.

Beim im Rahmen der Validierungsstudie verwendeten Gerät erfolgt die Ansteuerung des MCR 3 über LabView. Die Messprogramme (Probenmessung, Spülen etc.) wurden im Rahmen der Untersuchungen für die Milchapplikation optimiert und laufen fehlerfrei und vollautomatisch ab. Die Probenaufgabe erfolgt manuell über Plastik-Einwegspritzen. Dieses Handling hat sich in der Praxis gut bewährt. Die Messzeit einer Probenanalyse beträgt inklusive Bildaufnahme 6:15 min. Das Spülen des Probenschlauchsystems und die Regeneration der Chipoberfläche laufen direkt im Anschluss und dauern zusätzlich insgesamt 3:30 min. In mehrwöchigem Abstand wurden die Schläuche und Ventile gewechselt, da Milchablagerungen auch durch tägliches Spülen am Messtagesende nicht vollständig vermieden werden konnten. Die Datenauswertung der einzelnen CCD-Bilder läuft über eine neuentwickelte Auswertesoftware, die die Spotintensitäten durch Aufsummierung der zehn hellsten Pixel bestimmt. Aus der relativen Lichtintensität wird dann die entsprechende Antibiotika-Konzentration des/der Analyten errechnet.

Die Qualifizierung und Quantifizierung folgender 14 Antibiotika wurde erfolgreich optimiert: Sulfamethazin (SMA), Sulfadiazin (SDA), Streptomycin, Cloxacillin, Ampicillin, Penicillin G, Cephapirin, Neomycin B, Gentamicin, Erythromycin A, Tylosin, Enrofloxacin, Nafcillin und Ceftiofur. Der Nachweis von Tetrazyklin konnte im Rahmen des Forschungsprojektes nicht weiterentwickelt werden. Für die 7-Punktkalibrierung wurden die lyophilisierten Multistandards (Cocktail aus allen 14 Antibioitika) der Fa. AiM GmbH in einem Konzentrationsbereich von 0 - 1.000  $\mu\text{g/L}$  verwendet. Die Kalibrierdaten zusammengefasst von 148 Einzelmessungen sind in der Tab. 2 aufgelistet. Die Messbereiche der blau markierten Antibiotika beinhalten den entsprechenden MRL-Wert und ermöglichen die exakte Feststellung einer Grenzwertüberschreitung mit einmaliger Messung. Bei den anderen Antibiotika-Derivaten befindet sich der MRL-Wert oberhalb des ermittelten Arbeitsbereiches. Für diese Antibiotika ist das Testsystem zu empfindlich eingestellt, so dass im positiven Fall eine Wiederholung der Messung nach Verdünnung der Probe nötig ist.

**Tabelle 2:** Kalibrierdaten ( $m = 148$ ,  $n = 5$ ) der 14 detektierbaren Antibiotika im MCR 3

	MRL [µg/L]	Interassay-		WR1 [µg/L]	WR2 [µg/L]	Intraassay- Varianz CV <sub>SCL</sub> [%]
		TMP [µg/L]	Varianz CV <sub>TMP</sub> [%]			
<b>Sulfamethazin</b>	100	15	20	3	180	11
<b>Sulfadiazin</b>	100	17	23	4	275	6
<b>Streptomycin</b>	200	18	19	6	150	3
<b>Cloxacillin</b>	30	1	29	1	25	5
<b>Ampicillin</b>	4	9	29	3	100	8
<b>Penicillin G</b>	4	14	19	3	150	8
<b>Cephapirin</b>	60	35	27	1	380	11
<b>Neomycin</b>	1500	3	26	1	40	4
<b>Gentamicin</b>	100	3	30	2	25	3
<b>Erythromycin</b>	40	1	27	1	15	2
<b>Tylosin</b>	50	14	22	4	100	2
<b>Enrofloxacin</b>	100	1	28	1	10	7
<b>Nafcillin</b>	30	1	28	1	25	3
<b>Ceftiofur</b>	100	3	24	1	50	4

**Dunkelblau: MRL im Messbereich**

Die Interassay-Varianz (CV<sub>TMP</sub>) bezogen auf den Testmittelpunkt von 148 Kalibrierkurven (gemessen auf Chips aus unterschiedlichen Chargen) beträgt 25%. Die Intraassay-Varianz bezogen auf die Signalintensität (CV<sub>SCL</sub>) der fünf Spots pro Analyt (5 Messungen auf einem Chip) beträgt 6% ( $m = 5$ ,  $n = 5$ ). Diese Variationskoeffizienten sind jeweils gemittelt über alle 14 Antibiotika; die Einzelwerte sind der Tab. 2 zu entnehmen.

Neben der Bestimmung der Präzision der Messmethodik am MCR 3 wurde auch die Wiederfindung ermittelt. Gemittelt über alle 14 Antibiotika beträgt die Wiederfindungsrate 87%. Die Wiederfindung bei dem in der Veterinärmedizin am häufig eingesetzten Antibiotikum Penicillin G liegt bei sehr guten 95%. Neben Kalibriermessungen, Verschleppungstests, Untersuchung der Antibiotika-Chip-Stabilität und der Ermittlung der



Antikörperselektivitäten wurde des Weiteren der Einfluss der Rohmilchzusammensetzung auf das Messergebnis überprüft. Getestet wurde u.a. die Abhängigkeit vom Milchfettgehalt (2,4 - 5,6%), dem pH-Wert (5,3 - 8,0) sowie der Einfluss der Zellzahl (123.000 - 1,5 Mio./mL) bzw. Keimzahl ( $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$  KBE/ml). Eine signifikante Beeinflussung durch die Rohmilchzusammensetzung in den angegebenen Bereichen kann bei allen vier überprüften Faktoren ausgeschlossen werden.

Die erzielten Ergebnisse am MCR 3 wurden mit dem beim MPR verwendeten, kommerziell erhältlichen mikrobiologischen BRT-Hemmstofftest sowie den HPLC-MS-Messungen bei der muva (Kempton) verglichen. Alle Methoden liefern eine sehr gute Übereinstimmung mit vergleichbarer Konzentrationsangabe der detektierten Antibiotikaderivate. Tab. 3 zeigt repräsentative Ergebnisse der Referenzanalytik im Vergleich zum MCR 3.

**Tabelle 3:** Auflistung der gemessenen Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in hemmstoff-positiver Milch, die vergleichend mit dem MCR 3, dem BRT-Test und der HPLC-MS bestimmt wurden.

Detektierte Antibiotika	MRL [ $\mu\text{g/L}$ ]	BRT [ $\mu\text{g/L}$ ]	MCR 3 [ $\mu\text{g/L}$ ]	HPLC-MS [ $\mu\text{g/L}$ ]
Penicillin G	4	$\geq 4$	3,8	3,9
Penicillin G	4	$\geq 4$	6	4,3
Penicillin G	4	$\geq 40$	22	29,5
Penicillin G	4	$\geq 800$	833	976
Penicillin G, Neomycin B	4, 1.500	$\geq 16$	15, 56	14,9
Cloxacillin	30	$\geq 30$	25	21,1
Cloxacillin	30	$\geq 30$	37	34,1
Cloxacillin	30	$\geq 60$	102	105
Cloxacillin	30	$\geq 300$	265	281
Cloxacillin	30	$\geq 300$	200	274

Die durchgeführten Test- und Messreihen belegen eindeutig, dass Milchproben ohne Zusätze bzw. dotiert mit einem Analyten oder auch mit einer Kombination aus mehreren Hemmstoffen, erfolgreich am MCR 3 identifiziert und quantifiziert werden können. Die derzeit am MCR3 implementierten Nachweisverfahren beinhalten Wirkstoffe aus den folgenden Antibiotika-Gruppen: Sulfonamide (Sulfamethazin, Sulfadiazin), Fluorquinolone (Enrofloxacin), Makrolide (Tylosin, Erythromycin), Aminoglykoside (Streptomycin, Neomycin B, Gentamicin), Cephalosporine (Ceftiofur), und Betalaktame (Penicillin G,

Nafcillin, Cloxacillin). Aufgrund von Kreuzreaktivitäten vereinzelter Primärantikörper können darüber hinaus weitere Antibiotika-Derivate nachgewiesen werden: Dicloxacillin und Oxacillin werden über den Cloxacillin-Antikörper miterfasst, weitere Fluorchinolone wie Danofloxacin und Marbofloxacin über den Enrofloxacin-Antikörper, Amoxicillin über den Ampicillin-Nachweis, und Cefquinom über den Ceftiofur-Antikörper. In diesen Fällen ist keine exakte Hemmstoffdifferenzierung möglich. Bei den Primärantikörpern Cephapirin (starker Regenerationseffekt) und Ampicillin (Antibiotikum-Instabilität) steht noch eine zusätzliche Optimierung der Nachweisverfahren aus. Für einen erfolgreichen Tetracyclin-Nachweis sind eine Weiterentwicklung des Antibiotika-Chips sowie die Etablierung eines geeigneten Primärantikörpers notwendig.

Zusammenfassend konnte im Rahmen des Projektes gezeigt werden, dass das Biosensorsystem MCR 3 zur Identifizierung und Quantifizierung von antimikrobiellen Rückständen in Milch unter Routinebedingungen geeignet ist. Die im Forschungsprojekt erzielten Ergebnisse resultierten in einer deutlichen Verbesserung des Nachweises, die optimierte Version repräsentiert in Kombination mit der im Projekt etablierten Referenzanalytik ein bislang weltweit einmaliges integriertes System zur Ursachenaufklärung positiver Hemmstofftest-Befunde in Milch und wird nach Etablierung in den Untersuchungslabors wesentlich zur Qualitätssicherung von Milch und Milchprodukten beitragen.