

## **Abschlussbericht**

### **Durchführung eines zweiten 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

01.07.2019 – 31.12.2019

#### **Projektbearbeiter:**

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

## **Abschlussbericht**

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

#### **Hintergrund und Ausgangssituation :**

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.

In dieser Studie kristallisierten sich folgende Eckpunkte heraus, die den Einsatz als Routine- Screening Methode zunächst als nicht direkt geeignet erscheinen ließen:

- 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 detektier- und verifizierbar sind (Grauzone\*),
- Die nach diesem Verfahren als „Infiniplex –Positiv“ ausgewiesenen Proben, wiesen einen signifikant hohen Anteil an bereits eingetretener Säuerung und Denaturierung auf (Proteolyse)

Dies produzierte einen unplausiblen und schwer interpretierbar hohen Anteil an vermeintlich falsch-positiven Ergebnissen, sodass das System, auch im Hinblick auf eine weiterführende Verfolgsbeprobung von Einzellieferanten, als z.Zt. unbrauchbar für den Einsatz im niedersächsischen Rohmilchmonitoring eingestuft werden musste.

Um das Vorhaben dennoch voranzutreiben und für den Routineeinsatz zu optimieren, wurde eine zweite Projektphase mit der folgenden Aufgabenstellung durchgeführt:

## Antibiotika / Tierarzneimittel-Multi-Screening

### Projekt Phase II 2019

#### Zielstellung und durchgeführte Arbeiten

- **I Poolproben nach Erstellung gefrostet**

Bestmögliche „Konservierung“ der Rohmilchproben bis zur eigentlichen Untersuchung mit dem RANDOX Infiniplex Test

Ziel: Minimierung der (falsch)-Positivquote,  
Optimierung zur Eignung für ein Rohmilch Monitoring als Screeningmethode

- **II Medikamentenversuch Ausschleichkurve**

gezielte medikamentöse Behandlung von Milchkühen mit täglicher Probenahme

Ziel: Nachweis von Antibiotikarückständen über die üblichen  
Wartezeiten hinaus, Bestimmung der Detektionsgrenzen auch  
im Vergleich zu Referenzanalytik (LC-MS/MS)

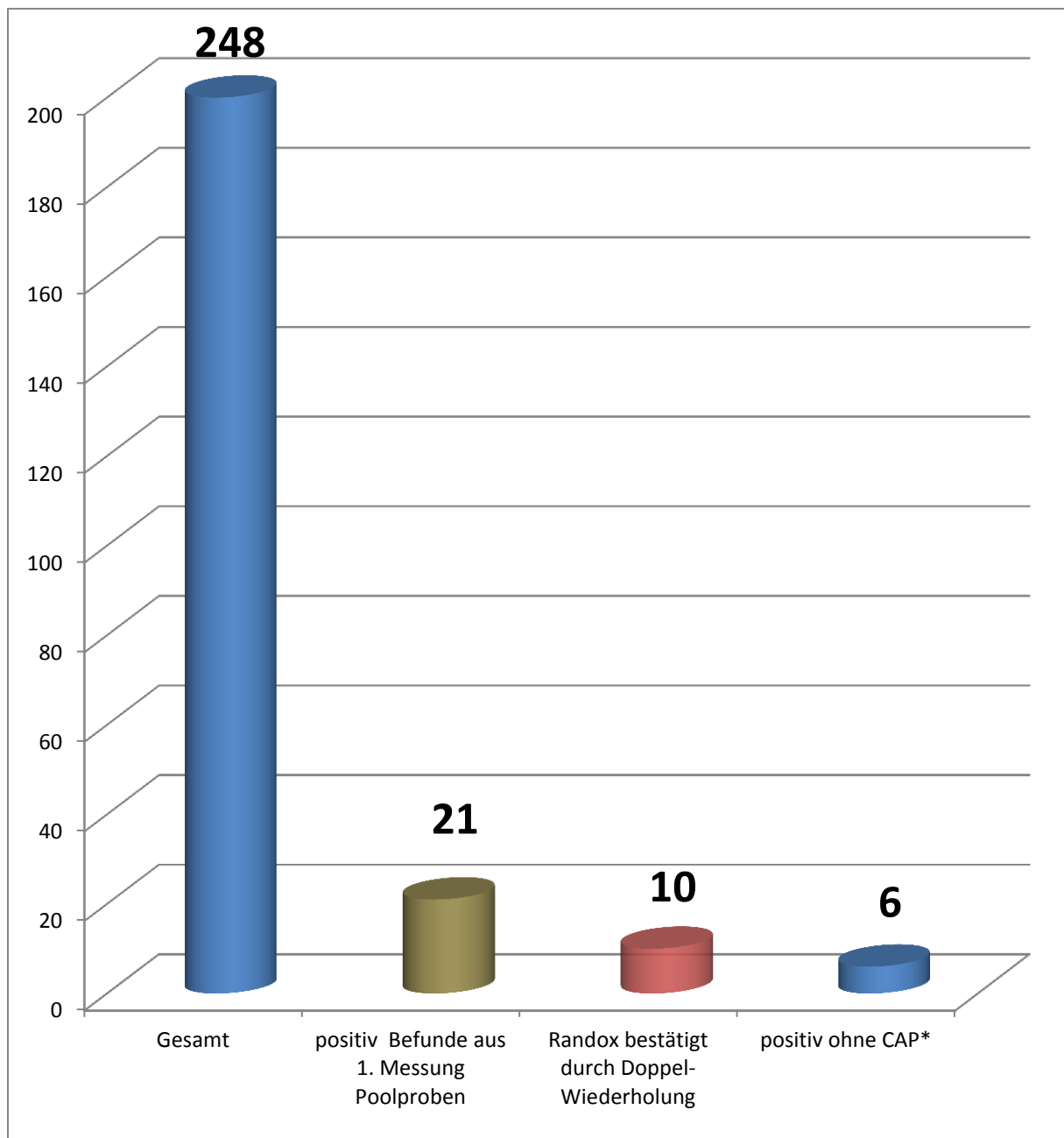
#### Zu I: Einsatz gefrorener Poolproben zum Test

Aus den laufenden Monitoring-Abrufen des 2. Halbjahres 2019 wurden gezielt regional ausgewählte Proben in den jeweilig zuständigen Untersuchungsstellen sofort nach Erstellung der Poolproben eingefroren, um so den bestmöglichen Zustand der Rohmilchen bis zum Zeitpunkt der eigentlichen Untersuchung zu gewährleisten.

#### Auswertung und Ergebnisse

Proben aus dem laufenden Rohmilch-Monitoring Abrufen:	<b>248</b>
Nachuntersuchungen und Wiederholungsmessungen:	42
Vergleichs- und Verifizierungsmessungen, Standards:	112
Messungen aus den Ausschleichversuchen :	28
<b>Mit RANDOX Infiniplex gemessene Proben gesamt:</b>	<b>430</b>

Von 248 Poolproben wurden im Screening-Meßgang (Single-Run) zunächst 21 Proben als „Positiv“ nach dem RANDOX Infiniplex Auswertalgorithmus ausgegeben, was einer Quote von ca. 8,5% entspricht.



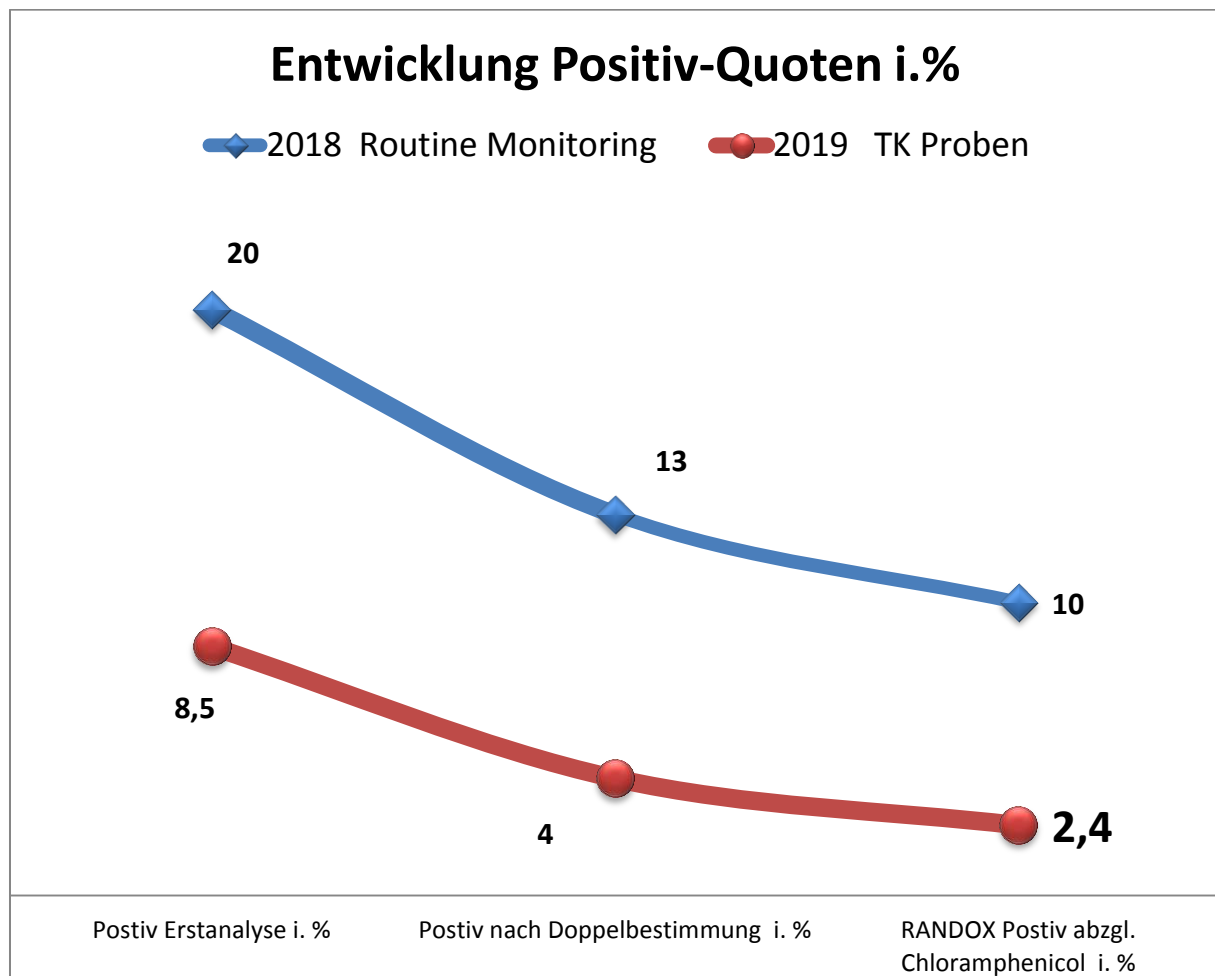
Der Infiniplex Verfahrensanweisung folgend müssen solche Proben in einer zusätzlichen Doppelbestimmung wiederholt gemessen werden.

Erst wenn sich danach ein doppelt positiver Befund ergibt, ist das Ergebnis als „Radox-Positiv“ zu bewerten und dann evtl. weiteren Untersuchungsschritten zuzuführen.

Durch dieses Prozedere verringerte sich die Positiv-Quote von 21 auf 10 Proben, entsprechend ca. 4%.

Lässt man zusätzlich die Chloramphenicol-auffälligen Proben außer Acht, unter der bekannten Annahme einer Kontaminationsquelle aus einer Acidiol-Konservierung, verringert sich der Anteil der, nach dem Monitoring System nachzuverfolgenden Proben auf insgesamt 6 Proben, entsprechend einer Gesamt-Quote von ca. 2,4%.

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus 2018 ergibt sich durch das Verfahren der Proben-Frostung eine **deutlich verringerte** und durchaus plausible Positiv-Quote.



## Verteilung der Wirkstoffgruppen am Anteil der Positiv-Proben

Bei den Positiv-Proben konnten die folgenden Wirkstoffgruppen detektiert werden:

- Chloramphenicol Bestätigung durch ELISA & LC-MS/MS  
*ausreichend hohe Konzentration vermutlich durch Eintrag aus Acidiol-Konservierung*
- Tetracycline Spuren im ELISA, negativ bei LC-MS/MS
- Sulphonamide Spuren im ELISA, negativ bei LC-MS/MS  
*Nachweis- und Bestimmbarkeitsgrenzen bei LC-MS/MS zu hoch*
- Meloxicam\* Höchstmenge: 15µg/kg Bestätigung durch LC-MS/MS (ca. 3µg/kg)

\*mit Meloxicam konnte erstmals in einer Poolprobe ein sogenannter nichtsteroidaler Entzündungshemmer (NSAIDs), der unter Anderem zur Behandlung von Mastitis eingesetzt wird, nachgewiesen werden, der im üblichen Tierarzneimittelscreening bisher nicht abgedeckt ist. Eine Untersuchung der zu der Poolprobe gehörenden Einzellieferanten-Proben ergab ebenfalls eine Auffälligkeit bei einem Erzeuger.

## Zu II: Ausschleimmessungen nach gezieltem Antibiotikaeinsatz

### Versuch 1:

In einem ersten Behandlungsversuch wurde das TA-Mittel „Synolox LC plus“ verabreicht. Dieses Mittel enthält als antibiotisch wirksame Bestandteile Amoxicillin (Penicillin  $\beta$ -Lactame) und Prednisolon. (Corticosteoride)

Das Mittel wurde der Verabreichungsvorschrift entsprechend zeitlich über drei Tage verabreicht. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde täglich eine Probe des Gemelks gezogen und unmittelbar danach bis zur Untersuchung eingefroren. Die Proben wurden sowohl mit dem RANDOX Infiniplex Test (Positiv/Negativ-Aussage) sowie referenzanalytisch (Identität / Quantität) untersucht.

Datum		LC-MS/MS - Nachweis Amoxicillin i. $\mu\text{g}/\text{kg}$	LC-MS/MS Nachweis Prednisolon i. $\mu\text{g}/\text{kg}$	RANDOX - Nachweis Amoxicillin (DL=2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RANDOX - Nachweis Prednisolon (DL=1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Bemerkung
Gabe	Tag 1	0	0	negativ	negativ	
	Tag 2	0	320	Positiv	Positiv	
	Tag 3	0	230	Positiv	Positiv	
	Tag 4	0	1,4	Positiv	Positiv	
Wartezeit	Tag 5	0	0	Positiv	negativ	
	Tag 6	0	0	Positiv	negativ	
	Tag 7	0	0	Positiv	negativ	
	Tag 8	0	0	Positiv	negativ	Nachuntersuchung negativ
	Tag 9	0	0	Positiv	negativ	Nachuntersuchung negativ
	Tag 10	0	0	negativ	negativ	
	Tag 11	0	0	negativ	negativ	
	Tag 12	0	0	negativ	negativ	
	Tag 13	0	0	negativ	negativ	
	Tag 14	0	0	negativ	negativ	

Hier zeigt das Randox-Verfahren aufgrund der niedrigen Schwellenkonzentrationen bei beiden Wirkstoffen eine nachvollziehbar gute Korrelation zu den vorgeschriebenen Wartezeiten.

Das LC-MS/MS-Verfahren bildet den Abbau der Konzentrationen bei Prednisolon ebenfalls gut ab, ist jedoch bei dem Wirkstoff Amoxicillin unbrauchbar, da die Bestimmbarkeitsgrenzen hier deutlich zu hoch sind.

## Versuch 2:

Um auch Wirkstoffgruppen darzustellen, die mit den zur Verfügung stehenden sehr sensiblen Einzel-ELISA Tests im unteren Spurenbereich qualitativ nachweisbar sind, wurde eine zweite Medikamentengabe und die anschließende Ausschleichphase analog Versuch 1 beprobt.

Zum Einsatz kam eine TA-Mittel Kombination aus „Ursocyclin 1090“ mit dem Wirkstoff Oxytetracyclin (Tetracycline) und dem Mittel „Diatrin“ mit den Wirkstoffen Sulfadiazin (Sulphonamide) und Trimethoprim (Diaminopyrimidine).

Wirkstoffgruppe	LC-MS/MS - Nachweis Oxytetracyclin i. mg/kg		LC-MS/MS Nachweis Sulfadiazin i. µg/kg		Ursocyclin 1090			Diatrin			
	LC-MS/MS Nachweis Oxytetracyclin i. mg/kg	LC-MS/MS Nachweis Sulfadiazin i. µg/kg	LC-MS/MS Nachweis Trimethoprim i. µg/kg	RANDOX - Nachweis Oxytetracyclin (DL=1,25 µg/kg)	Tetracycline DL=1,25 µg/kg	ELISA µg/kg	RANDOX - Nachweis Sulfadiazin (DL=14 µg/kg)	Sulphonamide µg/kg	ELISA µg/kg	RANDOX - Nachweis Trimethoprim (DL=13 µg/kg)	Gabe
Datum											
25.09.2019						X					
26.09.2019 Tag 1	0	0	0	Positiv	X	15	negativ	1	negativ		
27.09.2019 Tag 2	0	0	0	Positiv	X	10	negativ	2	negativ		
28.09.2019 Tag 3	0	0	0	Positiv	X	8	negativ	3	negativ		
29.09.2019 Tag 4	0	0	0	Positiv		20	negativ	2	negativ	X	
30.09.2019 Tag 5	3,9	0	0	Positiv		26	negativ	5	negativ	X	
01.10.2019 Tag 6	2,8	0	0	Positiv		25	negativ	3	negativ		
02.10.2019 Tag 7	1,0	0	0	Positiv		20	negativ	4	negativ		
03.10.2019 Tag 8	0,5	172	15,3	Positiv		11	Positiv	3	Positiv		
04.10.2019 Tag 9	0,3	196	8,0	Positiv		9	Positiv	3	Positiv		
05.10.2019 Tag 10	0,2	9,2	0	Positiv		6	Positiv	1	negativ		
06.10.2019 Tag11	0	0	0	Positiv		5	negativ	1	negativ		
07.10.2019 Tag12	0	0	0	Positiv		5	negativ	3	negativ		
08.10.2019 Tag 13	0	0	0	Positiv		4	negativ	2	negativ		
09.10.2019 Tag 14	0	0	0	Positiv		5	negativ	2	negativ		

Auch bei diesem Versuch zeigte das Randox-Verfahren eine gute Korrelation mit den zu erwartenden Ausschleichzeiten. Darüber hinaus waren bei dem Wirkstoff Oxytetracyclin noch kleinste Restmengen bis zum letzten Probenahmetag nachweisbar, bedingt durch die extrem niedrige Bestimmbarkeitsgrenze des Verfahrens. Der parallel eingesetzte ELISA Test für Tetracycline zeigte auch trotz der geringen Kreuzreaktion für Oxytetracyclin (ca.10%) ebenfalls Restmengen an, was das Positiv-Ergebnis des Randox-Test untermauert. Der parallel eingesetzte ELISA Test für Sulphonamide hatte keine Aussagekraft, da die eingesetzte Zielsubstanz Sulfadiazin eine zu geringe Kreuzreaktion aufwies.



### Fazit:

- Das Einfrieren der im Rohmilch-Monitoring erstellten Poolproben verringert die Positiv-Quote durch thermische „Konservierung“ der Rohmilchproben bis zur eigentlichen Untersuchung signifikant.
- Die verbleibende Positiv-Quote erscheint, in einem für ein Monitoring mit relativ hohem Probenaufkommen, plausiblen Rahmen auch in Bezug auf eventuelle Nachverfolgungen.
- Erstmals konnten Wirkstoffe, die im üblichen Untersuchungsportfolio nicht abgebildet werden/wurden, nachgewiesen und auch durch Referenzanalytik bestätigt werden.
- Die Ausschleichversuche zeigen eine gute Korrelation zu den vorgegebenen Wartezeiten. Einige Rückstände konnten auf Grund der teilweise hohen Sensibilität auch darüber hinaus noch als Untergrundbelastung nachgewiesen werden.
- Da aus dem Radox-Routine Verfahren eine Auswertung für eine Negativ/Positiv Aussage dahingehend interpretiert wird, das ein Positiv-Ergebnis die Überschreitung einer Wirkstoff-abhängigen Schwellenkonzentration (Decision-Level) darstellt, fehlt hier grundsätzlich eine Abschätzung der tatsächlichen Konzentration. Somit könnte ein als Positiv ausgegebener Wert sowohl nur knapp oberhalb dieses Schwellenwertes liegen, was im Rohmilch Monitoring dennoch einer Belastungsklasse A entspricht, oder aber, im ungünstigsten Fall, eine Höchstmengen-Überschreitung mit der Belastungsklasse C darstellen. In jedem Fall muss daher, ein nach diesem Verfahren attestiertes Positiv-Ergebnis einer Weiterverfolgung bzw. Vereinzelung der Poolproben in Einzellieferanten-Untersuchungen erfolgen.
- Aus dieser Kenntnis heraus und aus unserer Sicht als wünschenswert erachtet die Aussagekraft der Ergebnisse zu erweitern, hat die Fa. Radox ein zusätzliches, zunächst als Prototyp vorliegendes, grobes Klassifizierungsraster entwickelt, bei dem die Testergebnisse mittels einer Zusatzsoftware nochmals entsprechend ihrer Signalintensität geprüft werden. Ursprünglich „nur“ als Positiv gekennzeichnete Ergebnisse werden nun zusätzlich in einem dreistufigen Raster mit + / ++ / +++ bewertet. Diese Darstellung lässt zumindest eine grobe Aussage über die Höhe der Stoffgruppen-Konzentration zu. Ein solches semiquantitatives Auswerteverfahren wird seitens der Fa. Radox auch im Hinblick auf das im Rohmilch-Monitoring etablierten Belastungsklassen-Model intensiv weiterentwickelt.

- Die bis dato aufgefallenen Störfaktoren der ersten Evaluierungsphase aus 2018 konnten nachweislich durch geeignete Maßnahmen ohne größeren Aufwand deutlich minimiert werden und die dort angedeutete hohe Sensitivität einiger Stoffgruppen erwies sich als reproduzierbar. Da zusätzlich bisher nicht untersuchte Stoffgruppen durch dieses Verfahren aufgedeckt werden konnten, scheint das getestete Multi-Screening System durchaus geeignet, die Aussagekraft des bisherigen Rohmilchmonitorings im Hinblick auf pharmakologisch wirksame Substanzen deutlich zu erhöhen.
- Report einer erweiterten Betrachtung positiver Messergebnisse:

### Infiniplex for Milk Array - Individual Sample Report

Analyte	Reference Standard	Sample Result	Decision Level (ppb)
AFLATOXINM1	Passed	POS (+)	≥ 0.038
AMPHENICOLS	Passed	POS (+)	≥ <=>
APRAMYCIN	Passed	n.d.	< 6
BACITRACIN	Passed	n.d.	< 2
BAQUILOPRIM	Passed	n.d.	< 3
BETALACTAMS	Passed	POS (+++)	≥ <=>
CEFUROXIME	Passed	n.d.	< 8.5
CEPHALEXIN	Passed	n.d.	< 23
CHLORMADINONE	Passed	n.d.	< 1.2
DAPSONE	Passed	n.d.	< <=>
DEXAMETHASONE	Passed	n.d.	< <=>
ERYTHROMYCIN	Passed	n.d.	< <=>
GENTAMICIN	Passed	n.d.	< 22
HYDROXYFLUNXIN	Passed	n.d.	< <=>
HYGROMYCINB	Passed	n.d.	< 7.5
KANAMYCIN	Passed	n.d.	< 4
LINCOMYCIN	Passed	n.d.	< <=>
MELAMINE	Passed	n.d.	< <=>
MELOXICAM	Passed	n.d.	< 6
METAMIZOLE	Passed	n.d.	< <=>
METHYLPREDNISOLONE	Passed	n.d.	< <=>
NEOMYCIN	Passed	n.d.	< <=>
NITROXYNIL	Passed	n.d.	< 1.5
NOVOBIOICIN	Passed	n.d.	< 12.5
PHENYLBUTAZONE	Passed	n.d.	< <=>
PIRIMYCIN	Passed	n.d.	< 11
POLYMIXINS	Passed	n.d.	< <=>
QUINOLONES	Passed	n.d.	< <=>
RACTOPAMINE	Passed	n.d.	< 0.32
RIFAXIMIN	Passed	n.d.	< 1
SPECTINOMYCIN	Passed	n.d.	< 3
SPIRAMYCIN	Passed	n.d.	< <=>
STREPTOMYCIN	Passed	POS (++)	≥ <=>
SULPHAGUANIDINE	Passed	n.d.	< 20
SULPHAMETHAZINE	Passed	POS (++)	≥ <=>
SULPHAPYRIDINE	Passed	n.d.	< <=>
SULPHONAMIDES	Passed	n.d.	< <=>
TETRACYCLINES	Passed	POS (+++)	≥ <=>
TOBRAMYCIN	Passed	n.d.	< <=>
TOLFENAMICACID	Passed	n.d.	< <=>
TRIMETHOPRIM	Passed	n.d.	< 13
TYLOSIN	Passed	n.d.	< <=>
VIRGINIAMYCIN	Passed	n.d.	< 0.75

#### Key:

n.d. : Not detected

POS (+) / POS (++) / POS (+++) : Indicates level of positivity

<=> : Analyte concentration equivalence; This is a broad spectrum assay; refer to IFU for full decision levels

Date Of Print: 28 Nov 2019 12:55:41 PM

Machine ID: EI-11183

Page: 1 of 1

Printed By: lufa lufa

Sign Off: \_\_\_\_\_