



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 30 416 T2 2005.11.10

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 023 603 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 30 416.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/BE98/00147

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 947 242.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/018439

(86) PCT-Anmeldetag: 06.10.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.04.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 02.08.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 01.06.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.11.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: G01N 33/558

G01N 33/543

(30) Unionspriorität:

9700807 07.10.1997 BE

9800485 25.06.1998 BE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

UCB S.A., Brüssel/Bruxelles, BE

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(72) Erfinder:

DEGELAEN, Jacques, B-1470 Genappes, BE;  
FRERE, Jean-Marie, B-4550 Nantrin, BE;  
GRANIER, Benoît, B-4130 Esneux, BE; JORIS,  
Bernard, B-4900 Spa, BE

(54) Bezeichnung: TESTVORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ANALYTEN IN EINEM FLÜSSI-  
GEN MILCHPRODUKT

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Testvorrichtung für die Bestimmung von Analyten in einem flüssigen Milchprodukt, wie der Milch. Sie betrifft auch ein Verfahren, das den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Analyten in der Milch durch diese Testvorrichtung ermöglicht, sowie ein Testkit, das diese Testvorrichtung umfasst.

**[0002]** Derzeit schreiben die gesundheitspolizeilichen Forderungen zahlreicher Länder vor, die Gegenwart von verschiedenen Substanzen in den Milchprodukten, wie Tierarzneimittel und Hormone, die in der Viehzucht üblicherweise verwendet werden, regelmäßig zu kontrollieren. Aus offensichtlichen medizinischen Gründen müssen diese Substanzen in den Milchprodukten, die für den menschlichen Konsum bestimmt sind, vermieden werden.

**[0003]** In anderen Fällen ist es wünschenswert, über Tests zu verfügen, die es ermöglichen, die Gegenwart von endogenen Substanzen in der Milch nachzuweisen, um die Viehzuchtpрактиken zu optimieren. Insbesondere ermöglicht die schnelle Bestimmung des Hormongehalts in der Milch, die für die Reproduktion günstigen Perioden leicht zu erkennen.

**[0004]** In noch anderen Fällen sucht man nach praktischen und verlässlichen Verfahren, um die Herkunft der von Milch verschiedener Tierspezies stammenden Milchprodukte zu kontrollieren. Man sucht also nach Verfahren, die es ermöglichen würden, die Gegenwart von charakteristischen Proteinen der Milch bestimmter Spezies, verglichen mit anderen, zu erkennen.

**[0005]** Im Übrigen sind verschiedene Tests für den Nachweis von Analyten in biologischen Flüssigkeiten in der Literatur bekannt. Diese Tests verwenden im Allgemeinen Nachweisverfahren, die ein Erkennungsmittel (Rezeptor oder Antikörper), das den Analyten oder ein Analoges dieses Analyten spezifisch erkennt, und ein Markierungsmittel (radioaktives Isotop, Enzym, fluoreszierende Substanz usw.) einsetzen, die im Folgenden Nachweisreagenzien genannt werden. In Abhängigkeit von den gewählten Elementen spricht man von Radioimmuno-Assay (RIA), Radiorezeptor-Assay (RRA), Enzymimmuno-Assay (EIA) usw. In ihrem allgemeinen Prinzip setzen diese Tests die minimale Kombination der beiden oben angeführten Elemente (Nachweisreagenzien) ein, die es ermöglicht, ein Ergebnis zu erhalten, dessen Wert eine Angabe der Menge an vorhandenem Analyten ist.

**[0006]** Man sollte anmerken, dass in Abhängigkeit von dem gewählten Nachweisverfahren das Markierungsmittel entweder an das Erkennungsmittel oder an den Analyten oder an eine unter dem Gesichtspunkt ihrer Erkennung durch das Erkennungsmittel analoge Substanz des Analyten gekoppelt sein kann. Es gibt auch Verfahren, bei denen das Erkennungsmittel oder der Analyt oder die analoge Substanz des Analyten von sich aus das Markierungsmittel enthält (beispielsweise ein radioaktiv markierter Analyt).

**[0007]** Für die Milchprodukte betreffen die am häufigsten beschriebenen Tests zum Nachweis von Analyten den Nachweis von Antibiotika. Es ist nämlich gut bekannt, Antibiotika für die Behandlung bestimmter Infektionskrankheiten des Viehs, das Milch produziert, zu verwenden.

**[0008]** Nun muss aus offensichtlichen medizinischen Gründen die für den menschlichen Konsum bestimmte Milch im Prinzip frei von jeglicher Spur von Antibiotika sein. Außerdem können Penicillinkonzentrationen von 0,005 IE/ml oder weniger bei der Herstellung von Produkten, die von der Milch abgeleitet sind, wie Käse, Joghurt usw., verheerende Folgen haben.

**[0009]** Mehrere Situationen können in Betracht gezogen werden. In einem ersten Fall beispielsweise wird, um die Gegenwart von Antibiotika auf dem Hof nachzuweisen, bevor in einen Lastwagen umgegossen wird, ein extrem schneller (unter 5 Minuten) und einfacher Test bevorzugt werden. Man kann auch daran denken, einen solchen Schnelltest zu verwenden, wenn beispielsweise das Antibiotikum, das für die Behandlung verwendet wurde, bekannt ist und wenn außerdem dieser Test den Nachweis des fraglichen Antibiotikums in der gesetzlichen Norm ermöglicht. Im zweiten Fall, wenn die Betonung nicht auf der Schnelligkeit liegt, ist es von Bedeutung, die Mehrheit, wenn nicht sogar alle Antibiotika in den gesetzlichen Normen nachzuweisen.

**[0010]** Die Gesetzgebung bestimmter Länder schreibt nämlich sehr genaue Qualitätsnormen vor. Beispielsweise fordern die amerikanischen Behörden, dass die Konzentrationen der sechs folgenden Antibiotika in der Milch ganz genaue Werte nicht überschreiten: Penicillin, 5 ppb; Ampicillin, 10 ppb; Amoxicillin, 10 ppb; Cloxacillin, 10 ppb; Cephapirin, 20 ppb; Ceftiofur, 50 ppb. Auch die Europäische Gemeinschaft fordert Qualitätsnor-

men: Penicillin 4 ppb; Amoxicillin 4 ppb; Ampicillin 4 ppb; Cloxacillin 30 ppb; Dicloxacillin 30 ppb; Oxacillin 30 ppb; Cephapirin 10 ppb; Ceftiofur 100 ppb; Cefquinon 20 ppb; Nafcillin 30 ppb; Cefazolin 50 ppb.

**[0011]** Es könnte also interessant sein, über einen Test zu verfügen, der den Nachweis der Mehrheit der Antibiotika ermöglichen würde. Außerdem kann man im Bereich der Milchindustrie der Meinung sein, dass mangels eines Tests, der alle Merkmale an Schnelligkeit, Empfindlichkeit und Einfachheit aufweist, ein Test, der es ermöglichen würde, diese drei Parameter aufs Beste zu vereinen, selbst wenn sie nicht ganz abgedeckt sind, interessant wäre.

**[0012]** Das Patent US 4.239.852 beschreibt ein mikrobiologisches Verfahren für den Nachweis von Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamkern in der Milch. Gemäß diesem Verfahren wird die Milchprobe einerseits in Gegenwart von Zellteilen eines gegen die Antibiotika sehr empfindlichen Mikroorganismus, insbesondere *Bacillus stearothermophilus*, und andererseits in Gegenwart eines mit einem radioaktiven Element oder mit einem Enzym markierten Antibiotikums inkubiert. Die Inkubation wird unter Bedingungen ausgeführt, die es den gegebenenfalls in der Probe vorhandenen Antibiotika und dem markierten Antibiotikum ermöglichen, sich an die Zellteile zu binden.

**[0013]** Nach der Inkubation werden die Zellteile von dem Gemisch getrennt, dann gewaschen. Anschließend wird die Menge an markiertem, an die Zellteile gebundenem Antibiotikum bestimmt und mit einem Standard verglichen. Die Menge an markiertem, an die Zellteile gebundenem Antibiotikum ist umgekehrt proportional zu der Konzentration an Antibiotikum, das in der analysierten Milchprobe vorhanden ist.

**[0014]** Dieses Verfahren erfordert relativ schwierige Manipulationen, insbesondere bei der Abtrennung der Zellteile von dem Gemisch. Außerdem verwendet dieses Verfahren in seiner empfindlichsten Version ein Antibiotikum, das mit einem radioaktiven Element markiert ist ( $^{14}\text{C}$  oder  $^{125}\text{I}$ ). In diesem Fall erfordert die Bestimmung der Menge an Antibiotikum, das gegebenenfalls in der Milch vorhanden ist, dass man Zugriff auf ein spezielles Gerät, wie beispielsweise einen Scintillationszähler hat.

**[0015]** Zudem ist die Handhabung von radioaktiven Produkten, selbst in sehr geringen Mengen, nicht vollkommen gefahrlos für die Person, die die Analyse ausführt.

**[0016]** Die Europäische Patentanmeldung 593.112 beschreibt ein anderes Verfahren, das den Nachweis von Antibiotika in der Milch ermöglicht. Dieses Verfahren verwendet ein Protein, das aus einem gegen die Antibiotika empfindlichen Mikroorganismus, wie *Bacillus stearothermophilus*, isoliert wird. Dieses Protein wird außerdem mit einem Enzym, wie einer Peroxidase markiert.

**[0017]** Dieser Test geht auf die folgende Weise vor: eine Milchprobe wird in einem Röhrchen in Gegenwart des markierten Proteins inkubiert; nach der Inkubation wird die Milch in ein zweites Röhrchen überführt, auf dessen Wänden ein Referenz-Antibiotikum immobilisiert wurde; man nimmt eine zweite Inkubation vor, dann wird der Inhalt des Röhrchens entfernt; die Wände dieses zweiten Röhrchens werden dreimal mit einer Waschlösung gewaschen, die selbst entfernt wird, dann werden die in dem zweiten Röhrchen vorhandenen Rückstände auf ein absorbierendes Papier überführt; man gibt dann ein färbendes Substrat in das zweite Röhrchen, das von neuem inkubiert wird, dann gibt man eine Lösung zu, die die Farbentwicklung stoppt; die Färbung des Röhrchens wird mit der Färbung eines identischen Tests verglichen, der parallel an einer Standard-Antibiotikumprobe ausgeführt wurde. Die Menge an markiertem Protein, das auf dem Träger immobilisiert ist, und folglich die Intensität der Färbung ist umgekehrt proportional zu der Menge an Antibiotikum, das in der analysierten Milchprobe vorhanden ist.

**[0018]** Gemäß Beispiel 1 dieser Patentanmeldung ermöglicht dieser Test, Penicillin G bis zu Konzentrationen in der Größenordnung von 5 ppb nachzuweisen, und ermöglicht den Nachweis von Amoxicillin (5 ppb), Ampicillin (10 ppb), Cephapirin (5 ppb) und Ceftiofur (5 ppb).

**[0019]** Jedoch ist dieser Test ziemlich anspruchsvoll in der Durchführung, insbesondere durch nicht qualifiziertes Personal. Dieser Test umfasst nämlich zahlreiche Schritte, einschließlich Schritte des Umfüllens von Flüssigkeit und Rückständen und mehrere Schritte des Spülens. Aufgrund der Anzahl und der Art der Schritte, die in diesem Test erforderlich sind, hängt der Erhalt eines zuverlässigen Ergebnisses stark vom experimentellen Können des Ausführenden ab.

**[0020]** Außerdem erfordert es die Interpretation des Ergebnisses, parallel zwei Tests zu machen, was die Arbeitsvorgänge noch vervielfacht und kompliziert.

**[0021]** Man kennt auch andere Typen von enzymatischen Verfahren, die es ermöglichen, geringe Konzentrationen von Antibiotika in der Milch zu bestimmen (J.M. FRERE et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18(4), 506–510 (1980) sowie die Patente EP 85.667 und EP 468.946), die auf der Verwendung eines spezifischen Enzyms basieren, im vorliegenden Fall die lösliche exozelluläre D-Alanyl-D-alanincarboxypeptidase, die von Actinomadura R39 produziert wird, (im Folgenden mit "Enzym R39" bezeichnet). Das Enzym R39 besitzt eine spezifische Aktivität zur Hydrolyse der D-Alanyl-D-alanin-Gruppen von verschiedenen Peptiden und ist auch in der Lage, spezielle Thioester zu hydrolysieren.

**[0022]** Außerdem reagiert das Enzym R39 mit den Antibiotika mit β-Laktamkern, um sehr schnell einen äquimolaren Enzym-Antibiotikum-Komplex zu bilden, der inaktiv und fast irreversibel ist.

**[0023]** In der neuesten Version dieses Tests (EP 468.946) wird ein bestimmtes Volumen einer Probe der zu untersuchenden Flüssigkeit mit einer festgelegten Menge des Enzyms R39 unter Bedingungen inkubiert, die es dem β-Laktam-Antibiotikum, das gegebenenfalls in der Probe vorhanden ist, ermöglichen, mit dem Enzym zu reagieren, um einen äquimolaren Enzym-Antibiotikum-Komplex zu bilden, der inaktiv und fast irreversibel ist.

**[0024]** Dann wird eine bestimmte Menge an Substrat vom Thioestertyp mit dem in der ersten Stufe erhaltenen Produkt unter Bedingungen inkubiert, die die Hydrolyse des Substrats durch das restliche Enzym R39, das nicht mit dem Antibiotikum bei der ersten Inkubation komplexiert wurde, ermöglichen. Die so gebildete Menge an Mercaptoalkansäure wird dann durch kolorimetrische Bestimmung mit Hilfe eines Reagenzes bestimmt, das in der Lage ist, durch Reaktion mit der freien SH-Gruppe der Mercaptoalkansäure eine Färbung zu erzeugen. Die Intensität der Färbung wird mit einem Eichmaß verglichen, das vorab aus Proben, die bekannte Antibiotikamengen enthalten, aufgestellt wurde. Die quantitative Bestimmung kann durch Messung mit dem Spektrometer erfolgen; im Fall der Milch kann die vorherige Klärung der Probe sich als notwendig erweisen.

**[0025]** Klar, dieser Test umfasst weniger Schritte und ist einfacher einzusetzen als der in der Patentanmeldung EP 593.112 beschriebene Test. Jedoch ist er auf den Nachweis von Antibiotika mit β-Laktamkern beschränkt und dies bis zu den Nachweisgrenzwerten, die mit dem Enzym R39 zugänglich sind. Als solcher kann dieser Test nicht mit anderen Antibiotikarezeptoren verwendet werden und kann nicht direkt als Grundlage für den Nachweis von anderen Analyten in der Milch dienen.

**[0026]** EP 0 408 222 beschreibt eine Vorrichtung, die es ermöglicht, die in einer Flüssigkeit enthaltenen Be standteile zu trennen, diese Vorrichtung umfasst eine mikroporöse Trennmembran.

**[0027]** Da die derzeitigen Tests noch verschiedene Nachteile aufweisen, hat die Anmelderin sich zum Ziel gesetzt, nach neuen Verfahren für den Nachweis von Analyten in den flüssigen Milchprodukten zu suchen, wobei die gesuchten Verfahren die zuverlässige Bestimmung von verschiedenen Typen von Analyten vorzugsweise zum Zeitpunkt des Einsammelns auf dem Hof ermöglichen müssen. Die Anmelderin hat also ein Verfahren gesucht, das es ermöglicht, sehr schnell ein zuverlässiges und empfindliches Ergebnis in einer begrenzten Anzahl von einfachen Schritten, die kein besonderes experimentelles Können erfordern, zu erhalten. Außerdem hat die Anmelderin ein Verfahren gesucht, das ein Ergebnis liefert, das leicht visuell detektierbar ist und außerdem durch instrumentelle Messung quantifiziert werden kann.

**[0028]** Die Anmelderin hat jetzt entdeckt, dass diese Ziele durch die Verwendung einer neuen Testvorrichtung erreicht werden können, die es ermöglicht, die Gegenwart von Analyten in den flüssigen Milchprodukten, insbesondere der Milch, zu bestimmen.

**[0029]** Deshalb betrifft die vorliegende Erfindung eine Testvorrichtung, die es ermöglicht, die Gegenwart von Analyten in einem flüssigen Milchprodukt durch tangentiale Kapillarmigration besagten Milchprodukts nachzuweisen. Die erfindungsgemäße Testvorrichtung umfasst einen festen Träger (1), der ein erstes und ein zweites Ende besitzt, auf dem nacheinander, ausgehend von dem ersten Ende, aufgebracht sind

- eine Membran (2), die die Reinigung der analysierten Flüssigkeit ermöglicht,
- eine Membran (3), auf der eine oder mehrere Fangsubstanzen immobilisiert sind, und
- eine absorbierende Membran (4),

dadurch gekennzeichnet, dass die Membran (2) eine Leukosorb-Membran ist, die aus nicht gewebten Polyesterfasern hergestellt ist und in der Lage ist, die in dem Milchprodukt vorhandenen Substanzen zurückzuhalten, die die Migration der gegebenenfalls in dem Milchprodukt vorhandenen Analyten und der gemäß dem praktizierten Verfahren verwendeten Nachweisreagenzien auf der Testvorrichtung verhindern, und dies bei der

tangentialen Kapillarmigration der Probe nach Eintauchen des ersten Endes der Testvorrichtung in das analysierte Milchprodukt.

**[0030]** Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung besitzt die Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung außerdem eine Membran (5), auf der wenigstens ein Nachweisreagenz abgeschieden wurde, wobei dieses Nachweisreagenz in der Lage ist, sich in Gegenwart besagten Milchprodukts schnell aufzulösen. Gemäß dieser besonderen Ausführungsform muss die Membran (5) vor der Membran (3) liegen. Sie kann beispielsweise entweder vor der Membran (2) am ersten Ende der Vorrichtung oder zwischen der Membran (2) und der Membran (3) oder auch unterhalb oder oberhalb der Membran (2) liegen.

**[0031]** Die verschiedenen Membranen, die in der Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung vorhanden sind, überlagern sich an ihren Enden, so dass die kontinuierliche Migration des Milchprodukts von einer Zone in die andere sichergestellt ist. Vorzugsweise liegt die Membran (3) so, dass ihr nahe Ende unterhalb der Membran (2) liegt und ihr entferntes Ende unterhalb der Membran (4). Die Membranen können gegebenenfalls untereinander durch einen Plastikklebefilm (6) in Kontakt gehalten werden. In diesem Fall wird der Plastikklebefilm so gewählt, dass er die Migration der Flüssigkeit auf der Testvorrichtung nicht beeinträchtigt.

**[0032]** Die Option, die Testvorrichtung mit einem Plastikklebefilm zu bedecken, weist zwei Vorteile auf: er sorgt für einen sehr guten Kontakt an der Überlappung der Membranen und stellt einen Schutzfilm dar. Der Plastikklebefilm (6) kann entweder die Membranen (2), (3), (4) und (5) vollständig bedecken oder die einzelnen Membranen teilweise bedecken. Vorzugsweise bedeckt der Plastikklebefilm (6) die ersten Millimeter des ersten Endes nicht, um eine schnellere Migration der Flüssigkeit auf der Membran (2) der Testvorrichtung zu ermöglichen.

**[0033]** Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) erläutern Beispiele für Testvorrichtungen gemäß der vorliegenden Erfindung. Die [Fig. 1a](#), [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) stellen Frontalansichten dar und die [Fig. 1b](#) stellt eine Ansicht im Längsschnitt dar.

**[0034]** Der in der Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung vorhandene feste Träger (1) ist aus Glas oder aus Kunststoff, vorzugsweise aus Kunststoff. Im Fall eines Trägers aus Kunststoff liegt seine Dicke im Allgemeinen zwischen 0,05 und 1 mm, vorzugsweise zwischen 0,1 und 0,6 mm. Die Membranen sind auf dem festen Träger (1) durch einen Kleber befestigt.

**[0035]** Die Membran (2) kann von verschiedenen Arten sein. Einerseits muss sie in der Lage sein, die in dem Milchprodukt vorhandenen Substanzen zurückzuhalten, die die Migration der gegebenenfalls in dem Milchprodukt vorhandenen Analyten und der gemäß dem praktizierten Verfahren verwendeten Nachweisreagenzien auf der Testvorrichtung verhindern. Andererseits muss sie die schnelle Migration der Analyten und Nachweisreagenzien auf der Testvorrichtung ermöglichen und gleichzeitig die Aktivität dieser Analyten und Nachweisreagenzien bei dieser Migration bewahren. Ein nicht beschränkendes Beispiel für Membranen, die es ermöglichen, dieses Ergebnis zu erzielen, ist Leukosorb® LK4 (erhältlich bei Pall Gelman Sciences).

**[0036]** Die vorzugsweise verwendete Membran Leukosorb® ist eine Membran, die aus nicht gewebten Polyesterfasern hergestellt ist, die zur Retention von Leukozyten aus klinischen Proben, die aus Blut, Urin, Speichel und Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit stammen, bestimmt ist. Die Retention der Leukozyten wird durch Filtration der Flüssigkeit durch transversale Passage durch die Membran hindurch ausgeführt.

**[0037]** Die Anmelderin hat unerwarteterweise festgestellt, dass diese Typen von Membranen es auch ermöglichen, eine sehr wichtige Funktion für den Nachweis von Analyten in einem Milchprodukt durch die Testvorrichtungen gemäß der vorliegenden Erfindung sicherzustellen, nämlich die Retention der in den Milchprodukten vorhandenen Substanzen, die das gute Ablaufen eines Nachweistests durch tangentiale Kapillarmigration des Milchprodukts auf besagten Testvorrichtungen verhindern, wobei sie gleichzeitig die schnelle Migration der Analyten und Nachweisreagenzien gestatten.

**[0038]** Um diese Funktion optimal auszuführen, muss die Membran (2) ausreichend lang sein, um die Entfernung aller in dem Milchprodukt vorhandenen Substanzen, die die schnelle Migration der Analyten und Nachweisreagenzien auf der Versuchsvorrichtung verhindern, zu ermöglichen.

**[0039]** Die Membran (3) muss es ermöglichen, eine oder mehrere Fangsubstanzen zu immobilisieren, und muss die schnelle Migration der Milchproduktprobe nach der Passage über die Membran (2) gestatten. Vorzugsweise ist die Membran (3) auf einem nicht porösen Träger vom Polyestertyp gestützt. Nicht beschränkende Beispiele für Membranen, die sich gemäß der vorliegenden Erfindung eignen, sind Membranen aus Nitro-

cellulose mit hoher Kapillargeschwindigkeit, wie die Hi-Flow-Membranen (erhältlich bei Millipore), vorzugsweise die Hi-Flow-Membranen vom Typ SX oder ST. Diese Membranen liefern in Kombination mit den Membranen (2), wie zuvor gekennzeichnet, ein optimales Ergebnis.

**[0040]** Eine oder mehrere Fangsubstanzen werden auf der Membran (3) immobilisiert. Der Typ von immobilisierter Fangsubstanz hängt selbstverständlich von dem für den Nachweis der Analyten praktizierten Verfahren ab; die Fangsubstanzen sind in der Lage, wenigstens einen der Bestandteile, die in der auf der Testvorrichtung wandernden Flüssigkeit vorhanden sind, wie eins der Nachweisreagenzien oder das Produkt, das aus der Bildung eines Komplexes zwischen dem Analyten oder einer analogen Substanz dieses Analyten und wenigstens einem Nachweisreagenz resultiert, oder auch das Produkt, das aus der Bildung eines Komplexes zwischen mehreren Nachweisreagenzien resultiert, selektiv zu immobilisieren. Die Fangsubstanz kann auch eins der Nachweisreagenzien sein. Die Fangsubstanzen sind auf einem Teil oder mehreren gut abgegrenzten Teilen der Membran (3), wie Scheiben oder dünne Bänder oder jedes andere für die Anwendung geeignete Motiv, konzentriert platziert. Wie auch immer das gewählte Motiv sein mag, es muss es ermöglichen, ein klares Ablesen des Ergebnisses zu erzielen.

**[0041]** Bezuglich ihrer Größe muss die Membran (3) eine Länge haben, die ausreicht, um alle verwendeten Fangsubstanzen zu enthalten und dies in der Reihenfolge und in den Mengen, die gemäß dem praktizierten Nachweisverfahren erforderlich sind.

**[0042]** Der für die Membran (4) verwendete Membrantyp hat wenig Bedeutung, sofern diese in der Lage ist, die Flüssigkeit nach ihrer Passage über die vorherigen Membranen zu absorbieren und zu speichern. Die Membran (4) ist von ausreichend großer Abmessung, um die Absorption der Flüssigkeit nach ihrer Passage über die Membran (3) zu ermöglichen, aber auch, unter einem praktischen Gesichtspunkt, um ein leichteres manuelles Greifen der Testvorrichtung zu ermöglichen.

**[0043]** Gegebenenfalls kann die Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung eine Membran (5) umfassen, auf der wenigstens ein Nachweisreagenz abgeschieden wurde. Die Membran (5) muss die Migration des Milchprodukts ermöglichen und gleichzeitig das Lösen und Freisetzen des (oder der) Nachweisreagenzes (-zien) bei der Passage des Milchproduktstroms ermöglichen. Nicht beschränkende Beispiele für Membranen, die sich zu diesem Zweck eignen können, sind: die Membranen auf der Basis von Glasfaserharzen, wie die Membranen T5NM (erhältlich bei Millipore), die Membranen F075-14 oder F075-17 oder GF/C (erhältlich bei Whatman), die Membran Cytosep 1663 (erhältlich bei Pall Gelman Sciences), die Membranen auf der Basis von Polyesterfaserharzen, wie die Accuwick-Membranen (erhältlich bei Pall Gelman Sciences), 3 mm-Cellulosepapier (erhältlich bei Whatman) oder auch die Membranen vom Typ Release Matrix PT-R2 (erhältlich bei Advances Micro Devices). Vorzugsweise verwendet man eine Membran auf der Basis von Polyesterfaserharzen, wie die Accuwick-Membranen. Die Membran (5) hat eine Länge, die ausreicht, um die gewünschte Menge an Nachweisreagenz zu tragen.

**[0044]** Die Testvorrichtungen gemäß der vorliegenden Erfindung werden durch die dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt. Man kann beispielsweise Karten mit im Handel erhältlichen Laminatoren herstellen. Die verwendeten Fangsubstanzen werden in Form von Lösungen auf der Membran (3) vor oder nach dem Zusammenfügen der Karten abgeschieden. Das Abscheiden dieser Lösungen kann dank im Handel erhältlichen Geräten, wie der Dispenser X-Y Platform Biojet Quanti-3000 von Bio Dot, Inc., sehr genau durchgeführt werden. Diese abgeschiedenen Lösungen werden sogleich verdampft, beispielsweise indem man die Karte unter einen Heißluftstrom bringt. Für die Herstellung in großem Maßstab kann man auch Rollen herstellen. Dann werden die Karten und Rollen, die die gewünschten Fangsubstanzen tragen, in Streifen geschnitten, wobei jeder dieser Streifen eine erfindungsgemäße Testvorrichtung darstellt.

**[0045]** Wenn die Testvorrichtung eine Membran (5) umfasst, kann (können) das (die) Nachweisreagenz (-zien) vor dem Zusammenfügen der Karten oder Rollen durch einfaches Eintauchen der Membran (5) in eine Lösung, die das (die) Nachweisreagenz (-zien) enthält, darauf abgeschieden werden. Alternativ kann (können) es (sie) nach Zusammenfügen der Karten oder Rollen durch eine Technik abgeschieden werden, die zu derjenigen, die für das Abscheiden der Fangsubstanzen auf der Membran (3) verwendet wird, analog ist.

**[0046]** Bei einer Variante der Erfindung ist die Vorrichtung in ein Plastikgehäuse eingebracht, das zwei Öffnungen aufweist: die erste in Form einer Schale ist genau oberhalb der Membran (2) angebracht und ermöglicht es, die zu analysierende Flüssigkeit aufzunehmen; die zweite ist ein Öffnungsfenster, das es ermöglicht, das Ergebnis auf der Membran (3) sichtbar zu machen. In diesem Fall umfasst die Testvorrichtung keinen Plastikklebefilm (6).

**[0047]** Die Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht es, die Gegenwart von Analyten in einem flüssigen Milchprodukt, insbesondere der Milch, nachzuweisen.

**[0048]** Deshalb betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren für den Nachweis von Analyten in einem flüssigen Milchprodukt, das eine Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung sowie Nachweisreagenzien verwendet, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) das Inkontaktbringen eines bestimmten Milchproduktvolumens mit der Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung, wobei dieses Inkontaktbringen am ersten Ende der Testvorrichtung stattfindet,
- b) die tangentiale Migration durch Kapillarwirkung des Milchprodukts auf der Testvorrichtung, so dass die Analyten und die Nachweisreagenzien, die gegebenenfalls in dem Milchprodukt vorhanden sind, nach und nach die Membran (2), dann die Membran (3) durchlaufen und so dass die Bestandteile des Milchprodukts, die nicht von den Membranen (2) und (3) angehalten werden, in der Membran (4) enden und
- c) die Bestimmung einer Fixierung auf der Membran (3).

**[0049]** Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht es, Analyten in einem flüssigen Milchprodukt, beispielsweise Milch, Molke, Buttermilch, ..., nachzuweisen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich spezieller auf den Nachweis von Analyten, wie Tierarzneimittel, Hormone oder Proteine, die in der Milch vorhanden sein können.

**[0050]** Die gemäß dem Verfahren der Erfindung verwendeten Nachweisreagenzien können in Zahl und Art in Abhängigkeit von der Ausführungsform der Erfindung, die selbst auf dem praktizierten Nachweisverfahren basiert, variieren. Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet wenigstens zwei Nachweisreagenzien. Das erste Nachweisreagenz ist ein Erkennungsmittel, das in der Lage ist, den Analyten spezifisch zu erkennen, und wird im Folgenden "Identifizierungsmittel" genannt. Das zweite Nachweisreagenz ist ein Markierungsmittel und wird im Folgenden "Marker" genannt. Man sollte feststellen, dass in Abhängigkeit von der gewählten Ausführungsform bestimmte Nachweisreagenzien auf der Membran (3) oder auf der Membran (5) vorhanden sein können. In Abhängigkeit von dem nachzuweisenden Analyten und den verwendeten Nachweisreagenzien kann es sich als notwendig erweisen, ein oder mehrere Nachweisreagenzien vor dem Schritt des Inkontaktbringens des Milchprodukts mit der erfindungsgemäßen Testvorrichtung hinzuzufügen und dieses Gemisch unter Inkubationsbedingungen zu halten, die die Bildung eines Komplexes zwischen Nachweisreagenzien und dem Analyten oder einer analogen Substanz des Analyten ermöglichen. In Abhängigkeit von dem gewählten Verfahren können das Identifizierungsmittel und der Marker untereinander gekoppelt sein oder können nur eine einzige und gleiche Substanz sein. Andererseits kann es mehrere Identifizierungsmittel und/oder Marker geben.

**[0051]** Das Identifizierungsmittel ermöglicht es, die Gegenwart des gesuchten Typs von Analyt aufgrund seiner Fähigkeit nachzuweisen, diesen Analyten oder eine analoge Substanz dieses Analyten spezifisch zu erkennen. Es kann sich um einen Rezeptor, der in der Lage ist, selektiv einen stabilen und im Wesentlichen irreversiblen Komplex mit dem Analyten oder einer analogen Substanz des Analyten zu bilden, oder um einen spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper des Analyten oder einer analogen Substanz des Analyten handeln. Für den Nachweis von Antibiotika kann das Identifizierungsmittel ausgewählt sein unter spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder unter den Rezeptoren, die aus Mikroorganismen erhalten werden, die gegen die Antibiotika empfindlich sind, wie die Rezeptoren, die aus den Spezies *Bacillus* (*Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, ...), *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*, ...), *Actinomycetes* (*Actinomadura R39*, ...) erhalten werden.

**[0052]** Gemäß einer bevorzugten Durchführungsform der Erfindung verwendet man ein Identifizierungsmittel, das einen gegen die Antibiotika mit β-Laktamkern empfindlichen Rezeptor umfasst, der aus *Bacillus licheniformis* erhalten wird, wie der Rezeptor BlaR oder der Rezeptor BlaR-CTD. Die Isolierung und die Peptidsequenz des Proteins BlaR sind in Y. ZHU et al., J. Bacteriol., 1137-1141 (1990) beschrieben; der Rezeptor BlaR-CTD ist die endständige Carboxydomäne von BlaR, dessen Isolierung und Peptidsequenz in B. JORIS et al., FEMS Microbiology Letters, 107-114 (1990) beschrieben sind.

**[0053]** Die Verwendung der Rezeptoren BlaR oder BlaR-CTD gemäß der vorliegenden Erfindung für den Nachweis von Antibiotika mit β-Laktamkern weist wichtige Vorteile verglichen mit den bis heute verwendeten Erkennungsmitteln auf. Die Rezeptoren BlaR und BlaR-CTD sind nämlich in der Lage, eine große Anzahl an Antibiotika sehr schnell zu komplexieren und dies bei einer Inkubationstemperatur, die niedriger als diejenige ist, die für die bekannten Erkennungsmittel, wie beispielsweise die Rezeptoren, die aus *Bacillus stearothermophilus* erhalten werden, benötigt wird.

**[0054]** Der zweite Typ von verwendetem Nachweisreagenz ist ein Marker, der es ermöglicht, direkt oder indi-

rekt die Gegenwart der Analyten in dem Milchprodukt sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Die erfindungsgemäß verwendbaren Marker können partikelartig, fluoreszierend, radioaktiv, lumineszierend oder enzymatisch sein. Man wählt vorzugsweise einen Partikelmarker, der ein leicht detektierbares visuelles Signal liefert, selbst wenn dieser in geringer Menge vorhanden ist. Als nicht beschränkende Beispiele seien die kolloidalen Metallpartikel (Platin, Gold, Silber usw.), die kolloidalen Selen-, Kohlenstoff-, Schwefel-, Tellurpartikel oder auch die kolloidalen Partikel von farbigen synthetischen Latizes angeführt. Die kolloidalen Goldpartikel mit einem Teilchendurchmesser zwischen 1 und 60 nm sind besonders bevorzugt: sie liefern eine intensive rosa-rote Färbung, die leicht detektierbar ist.

**[0055]** Der Marker ermöglicht es, die Gegenwart des Analyten in der Milchproduktprobe durch seine Kopplung an ein oder mehrere Nachweisreagenzien, an den Analyten oder an eine analoge Substanz des Analyten zu bestimmen.

**[0056]** Die Kopplung zwischen dem Marker und dem Nachweisreagenz kann gemäß den Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, durchgeführt werden. Wenn man einen Partikelmarker verwendet, kann das Markieren entweder durch direkte Adsorption an die Partikel oder indirekt über den Umweg eines chemischen Verankerungsarms, wie beispielsweise ein Biotin/Anti-Biotin-Komplex, stattfinden. Diese Kopplung kann entweder vor dem Schritt des Inkontaktbringens des Milchprodukts mit der erfindungsgemäßen Testvorrichtung oder während der Migration des Milchprodukts auf der erfindungsgemäßen Testvorrichtung stattfinden.

**[0057]** Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung verwendet man einen dritten Typ von Nachweisreagenz, der im Folgenden "Referenz" genannt wird. Es handelt sich um eine Substanz, die in bekannter Menge zu der analysierten Probe hinzugefügt wird und die sich an einer spezifischen Fangsubstanz, die auf der Membran (3) immobilisiert ist, fixiert. Die Referenz liefert eine Bande, deren Intensität als Standard für die Quantifizierung des Analyten dient.

**[0058]** Das Inkontaktbringen des Milchprodukts mit der erfindungsgemäßen Testvorrichtung (Schritt a) des Verfahrens), wird durchgeführt, indem man die Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung in einen Behälter gibt, auf dessen Boden sich die zu analysierende Probe befindet. Die Testvorrichtung wird im Wesentlichen vertikal in dem Behälter platziert, so dass das erste Ende der Vorrichtung mit dem Gemisch in Kontakt ist.

**[0059]** Bei der Variante der Erfindung, die eine in einem Plastikgehäuse eingebrachte Testvorrichtung verwendet, wird dieses horizontal aufgestellt und das Inkontaktbringen erfolgt, indem man ein Aliquot an zu analysierender Probe in die Öffnung in Form einer Schale, die oberhalb der Membran (2) angebracht ist, gibt.

**[0060]** Für den Migrationsschritt b) lässt man die Flüssigkeit durch Kapillarwirkung auf der erfindungsgemäßen Testvorrichtung wandern. Die Flüssigkeit, die durch Kapillarwirkung auf der erfindungsgemäßen Testvorrichtung wandert, trifft zuerst auf die Membran (2), die es ermöglicht, die in dem Milchprodukt vorhandenen Substanzen, die die Migration der gegebenenfalls in dem Milchprodukt vorhandenen Analyten und Nachweisreagenzien auf der Testvorrichtung verhindern, zurückzuhalten. Die Analyten und die Nachweisreagenzien wandern dann über die Membran (3), auf der eine oder mehrere Fangsubstanzen immobilisiert wurden. Die Fangsubstanzen immobilisieren selektiv wenigstens einen der Bestandteile, die in der analysierten Flüssigkeit vorhanden sind. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung verwendet man eine Fangsubstanz, die am Ende der Migrationsstrecke der Flüssigkeit auf der Membran (3) platziert ist, die in der Lage ist, alle Marker, die nicht durch die vorherigen Fangsubstanzen gehalten wurden, zu fixieren. Diese Fangsubstanz ermöglicht es, die von den vorherigen Fangsubstanzen gelieferten quantitativen Informationen zu vervollständigen.

**[0061]** Die Bestimmung einer Fixierung auf der Membran (3) (Schritt c) des Verfahrens) erfolgt einfach, indem man die Gegenwart von Markern in dieser Zone bestimmt. Diese Bestimmung ist einfach visuell möglich. Wenn man jedoch eine genaue Messung der Intensität der beobachteten Signale haben will, kann man auf ein Gerät zurückgreifen, das in der Lage ist, die Intensität des beobachteten Signals zu messen. Wenn man eine Referenz verwendet, wird sie durch eine spezifische Fangsubstanz fixiert, die einen inneren Standard für die Messung der Intensität der beobachteten Signale liefert.

**[0062]** Die Interpretation des erhaltenen Ergebnisses hängt von dem praktizierten Nachweisverfahren, nämlich den verwendeten Nachweisreagenzien und Fangsubstanzen ab.

**[0063]** Verglichen mit den zuvor in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Nachweis von Analyten in der Milch weist das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die folgenden Vorteile auf. An erster Stelle ist

dieses Verfahren sehr schnell und extrem einfach durchzuführen: es umfasst im Wesentlichen zwei leichte Manipulationsschritte, die kein besonderes experimentelles Können erfordern. Dann ist die qualitative und quantitative Auswertung des Ergebnisses unmittelbar und erfordert keine besonderen zusätzlichen Arbeitsvorgänge, wie diejenigen, die erforderlich sind, wenn der Nachweis mit Farbstoffen und/oder enzymatischen Markern ausgeführt wird. Außerdem ist dieses Verfahren direkt anwendbar für den Nachweis von verschiedenen Typen von Analyten. Schließlich ist bei der Ausführungsform, die eine Referenz verwendet, das Ergebnis direkt interpretierbar und quantifizierbar, ohne dass es notwendig wäre, auf einen oder mehrere Vergleichstests zurückzugreifen.

**[0064]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren, wie in den Ansprüchen 14, 15 und 19 definiert.

**[0065]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Testkit für den Nachweis von Analyten in einem Milchprodukt, das eine Testvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst. Gegebenenfalls kann das Testkit gemäß der vorliegenden Erfindung auch Nachweisreagenzien enthalten, die der Probe vor dem Inkontaktbringen des Milchprodukts mit der Testvorrichtung hinzuzufügen sind.

**[0066]** Die folgenden Beispiele erläutern verschiedene Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ohne jedoch dadurch ihre Reichweite zu beschränken.

#### Beispiel 1. Herstellung der Testvorrichtungen. Allgemeine Arbeitsweisen.

##### 1.1. Zusammenfügen von Membrankarten.

**[0067]** Karten mit einer Größe von 300 × 76,2 mm werden mittels eines Laminators vom Typ Chlamshell Laminator (erhältlich bei Bio Dot, Inc.) gemäß dem folgenden Verfahren zusammengebaut:

Man schneidet ein Rechteck aus einem Plastikträger vom Typ ArCare 8565 (erhältlich bei Adhesive Research) in der Größe 300 × 76,2 mm zu (fester Träger (1)). Man schneidet dann ein Rechteck aus der Membran Leukosorb® LK4 (erhältlich bei Pall Gelman Sciences) in der Größe 300 × 20 mm (Membran (2)), ein Rechteck aus der Membran Hi-Flow SX (erhältlich bei Millipore) in der Größe 300 × 25 mm (Membran (3)), ein Rechteck aus der Membran 3 mm-Cellulose (erhältlich bei Whatman) in der Größe 300 × 40 mm (Membran (4)) und ein Rechteck aus der Membran Accuwick (erhältlich bei Pall Gelman Sciences) in der Größe 300 × 0,8 mm (Membran (5)) zu.

**[0068]** Man bringt nacheinander die Membranen (2) und (4), dann (5), dann (3) an einer speziellen Stelle der unteren Form des Laminators unter. Der mit Kleber bedeckte feste Träger (1) wird im Deckel des Geräts gehalten, wobei die Kleberseite der Luft ausgesetzt ist. Die in der unteren Form untergebrachten Membranen werden mit dem klebenden Träger in Kontakt gebracht, indem man den Laminator schließt; die Membranen werden mittels Luftsaugen, das durch eine Vakuumpumpe ausgeführt wird, exakt an Ort und Stelle gehalten. Wenn das Vakuum unterbrochen wird, gewinnt man eine Karte, die aus dem festen Träger (1) besteht, auf dem die Membranen (2), (3), (4) und (5) fixiert sind.

##### 1.2. Abscheidung der Fangsubstanzen auf der Membran (3).

**[0069]** Die Abscheidung der Fangsubstanzen auf der Membran (3) wird vor oder nach dem Zusammenfügen gemäß Beispiel 1.1. ausgeführt.

**[0070]** Man stellt eine wässrige Lösung, die die Fangsubstanz enthält, her. Sie wird auf der Membran (3) der in Beispiel 1.1. hergestellten Membrankarte mit einem "Dispenser" vom Typ X-Y Platform Biojet Quanti-3000 von Bio Dot, Inc. abgeschieden.

**[0071]** Die abgeschiedenen Lösungen werden sofort verdampft, indem man die ganze Karte eine Minute lang unter ein Heißluftgebläse bei 60 °C stellt.

##### 1.3. Abscheidung der Markierungssubstanz auf der Membran (5).

###### a) Vor dem Zusammenfügen gemäß Beispiel 1.1.

**[0072]** Man stellt eine wässrige Lösung, die die Markierungssubstanz enthält, her. Die Membran (5) wird in diese Lösung eingetaucht. Man lässt sie dann abtropfen, dann wird sie eine Nacht bei Raumtemperatur unter einem Vakuum von 0,5 bar getrocknet.

(b) Nach dem Zusammenfügen gemäß Beispiel 1.1.

**[0073]** Man verfährt gemäß der in Beispiel 1.2. für die Abscheidung der Fangsubstanzen beschriebenen Arbeitsweise.

1.4. Aufbringen des Plastiklebefilms (6).

**[0074]** Man schneidet ein Rechteck aus Klebefilm vom Typ ArCare 7759 (erhältlich bei Adhesive Research) in der Größe von  $300 \times 20$  mm für eine teilweise Bedeckung und  $300 \times 71,2$  mm für eine Bedeckung aller Membranen zu.

**[0075]** Die gemäß Beispiel 1.1. erhaltene Karte wird in die untere Form eines Laminators gegeben und der Klebefilm wird in den Deckel des Laminators gelegt, wobei die Klebeseite der Luft ausgesetzt ist. Der Plastiklebefilm wird mit der Membrankarte beim Schließen des Geräts in Kontakt gebracht.

1.5. Zuschnitt zu Streifen.

**[0076]** Die nach dem Zusammenfügen erhaltenen Karten werden mit Hilfe eines Geräts vom Schlagscherentyp oder mit Hilfe eines rotierenden Geräts (erhältlich bei Bio Dot, Kinematic oder Akzo) zu Streifen geschnitten. Die Endstreifen werden entfernt und die anderen Streifen sind gebrauchsfertig.

**[0077]** Für ihre Aufbewahrung werden die Testvorrichtungen in einen lichtundurchlässigen und hermetisch verschlossenen Behälter in Gegenwart eines Trocknungsmittels (Silgelac, Frankreich) gegeben.

1.6. Anordnung in einem Plastikgehäuse.

**[0078]** Man gibt die Testvorrichtung in ein Plastikgehäuse, das zwei Öffnungen aufweist: die erste in Form einer Schale ist genau oberhalb der Membran (2) angeordnet und ermöglicht es, die zu analysierende Flüssigkeit aufzunehmen; die zweite ist ein Öffnungsfenster, das es ermöglicht, das Ergebnis auf der Membran (3) sichtbar zu machen.

Beispiel 2. Nachweis von Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamkern in der Milch mittels des Enzyms R39.

2.1. Identifizierungsmittel.

**[0079]** Das in diesem Beispiel verwendete Identifizierungsmittel ist die lösliche exozelluläre D-Alanyl-D-alanin-carboxypeptidase, die von Actinomadura R39 produziert wird, erhalten gemäß der von J.-M. FRERE et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18(4), 506-510 (1980) beschriebenen Arbeitsweise.

2.2. Kopplung des Identifizierungsmittels an den Marker.

2.2.1. Biotinylierung des Identifizierungsmittels.

**[0080]** 250  $\mu$ l einer wässrigen Lösung von Enzym R39 mit 1 mg/ml werden 24 Stunden lang gegen 500 ml HNM-Puffer (Hepes 10 mM, pH 8, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) dialysiert. Man fügt dann zu dieser dialysierten Lösung von Enzym R39 2 ml Bicarbonatpuffer (0,1 M an Natriumbicarbonat, pH 9) und 250  $\mu$ l einer Lösung von 6-(Biotinamido)capronsäure-N-hydroxysuccinimidester mit 5 mg/ml in wasserfreiem DMF hinzu. Diese Lösung wird langsam auf einem Rührer für Röhrchen auf einer Drehachse vom Typ LABINCO (erhältlich bei VEL, Belgien) mit einer Geschwindigkeit von 2 Umdrehungen/Minute 3 Stunden lang bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt gerührt. Die so erhaltene Lösung wird gegen HNM-Puffer (Hepes 100 mM; pH 8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) 24 Stunden lang dialysiert. Auf diese Weise erhält man eine Lösung von biotinyliertem Enzym R39, die man in HNM-BSA-Puffer (Hepes 500 mM; pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml) bis auf eine Konzentration von 100  $\mu$ g Enzym R39 pro ml Puffer verdünnt. Diese Lösung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2. Marker.

**[0081]** Als Marker verwendet man Goldpartikel mit einem Durchmesser von 40 nm, auf denen ein anti-Biotin-Antikörper aus der Ziege abgeschieden wurde, in Form von Suspensionen in einer wässrigen Natriumtetaboratlösung mit 2 mM bei pH 7,2, die durch Natriumazid 0,1%ig stabilisiert ist, (erhältlich bei BRITISH BIOCELL (Ref. GAB40)). Die optische Dichte dieser Suspensionen bei 520 nm beträgt etwa 10 und die Konzentration

an Protein ist etwa 24 µg/ml.

### 2.2.3. Kopplung des biotinylierten Identifizierungsmittels an den Marker.

#### Lösung A für den Schnelltest

**[0082]** Die Lösung von biotinyliertem Enzym R39, die in Beispiel 2.2.1. hergestellt wurde, wird 25-mal mit HNM-BSA-Puffer (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml) verdünnt. Man mischt bei Raumtemperatur 17,5 Volumenteile dieser verdünnten Lösung von biotinyliertem Enzym R39, 9,27 Volumenteile Goldpartikelsuspension, die dazu dient, das Enzym R39 zu markieren, und 6 Volumenteile Referenz-Goldpartikelsuspension (siehe Beispiel 2.3).

#### Lösung B für den empfindlichen Test

**[0083]** Die Lösung von biotinyliertem Enzym R39, die in Beispiel 2.2.1. hergestellt wurde, wird 50-mal mit HNM-BSA-Puffer (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml) verdünnt. Man mischt bei Raumtemperatur 17,5 Volumenteile dieser verdünnten Lösung von biotinyliertem Enzym R39, 9,27 Volumenteile Goldpartikelsuspension, die dazu dient, das Enzym R39 zu markieren, und 6 Volumenteile Referenz-Goldpartikelsuspension (siehe Beispiel 2.3).

### 2.3. Referenz.

**[0084]** Als Referenz verwendet man Goldpartikel mit 40 nm, auf denen ein Anti-Kaninchen-Immunoglobulin-Antikörper aus der Ziege abgeschieden wurde. Diese Partikel sind bei BRITISH BIOCELL (Ref. GAR40) erhältlich in Form von Suspensionen in einer wässrigen Natriumtetraboratlösung mit 2 mM bei pH 7,2, die durch Natriumazid 0,1%ig stabilisiert ist. Die optische Dichte dieser Suspensionen bei 520 nm beträgt etwa 3 und die Konzentration an Protein ist etwa 6 µg/ml.

### 2.4. Fangsubstanzen.

#### 2.4.1. Erste Fangsubstanz.

**[0085]** 8 ml einer Lösung, die 213 mg menschliches Gammaglobulin (G4386, Sigma) und 8,6 mg 2-Iminothiolan Hydrochlorid (Aldrich, 33056-6) in Natriumcarbonatpuffer (100 mM; pH 9) enthält, werden eine Stunde lang bei 25 °C inkubiert.

**[0086]** Außerdem werden 20 ml einer Lösung, die 119,8 mg Cephalosporin-C und 54 mg Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (sSMCC, 22322 Pierce) in Natriumcarbonatpuffer (100 mM, pH 9) enthält, eine Stunde lang bei 25 °C inkubiert.

**[0087]** Die beiden zuvor hergestellten Lösungen werden dann gemischt. Man stellt den pH der resultierenden Lösung durch Zugabe von 3 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500 mM auf 7,1 ein und man inkubiert zwei Stunden lang bei 25 °C. Das nach Inkubation erhaltene Gemisch wird dreimal gegen 1 Liter Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5) dialysiert. Die resultierende Lösung wird über ein 0,22 µm-Filter filtriert und dann wird sie in gleiche Teile aufgeteilt und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

**[0088]** Bei der Verwendung werden die Aliquote aufgetaut und man fügt dazu einen Lebensmittelfarbstoff hinzu, bevor man die Abscheidung auf der Membran ausführt, um zu jedem Zeitpunkt die exakte Position der Abscheidung und die Qualität des Strichs zu beurteilen.

**[0089]** Die erste Fangsubstanz ermöglicht es, die freien an die Marker gekoppelten Identifizierungsmittel, die in Bezug auf die Menge an in der Probe vorhandenem Antibiotikum im Überschuss sind, zu fixieren.

#### 2.4.2. Zweite Fangsubstanz.

**[0090]** Für die zweite Fangsubstanz verwendet man eine Lösung von Kaninchen-Immunoglobulin (Sigma I 5006) mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml an Immunoglobulin in Natriumphosphatpuffer 10 mM, pH 7,5, menschliches Gammaglobulin 5 mg/ml. Diese zweite Fangsubstanz stoppt die Referenz bei der Migration der Flüssigkeit auf der Testvorrichtung.

## 2.5. Testvorrichtung.

**[0091]** Man verwendet Testvorrichtungen, die die Membranen (2), (3) und (4) enthalten, die gemäß der in Beispiel 1.1. beschriebenen Arbeitsweise zusammengefügt sind. Die Membran (3) dieser Vorrichtungen trägt auf der nahen Seite die in Beispiel 2.4.1. beschriebene Fangsubstanz und auf der entfernten Seite die in Beispiel 2.4.2. beschriebene Fangsubstanz. Die Fangsubstanzen wurden gemäß dem in Beispiel 1.2. beschriebenen Verfahren abgeschieden.

## 2.5.1. Test 1 – Schnelltest

**[0092]** Man stellt sieben Milchproben her, die jeweils 0; 2; 4; 5; 6; 8 und 10 ppb Penicillin G enthalten. Jede dieser Lösungen wird dann auf die folgende Weise analysiert.

**[0093]** Man entnimmt ein Aliquot von 200 µl Milchprobe und 32,8 µl in Beispiel 2.2.3. hergestellte Lösung A, die man in ein Eppendorf-Röhrchen gibt. Dieses Gemisch wird 3 Minuten lang bei 47 °C inkubiert. Man stellt dann eine Testvorrichtung vertikal in das Eppendorf-Röhrchen, so dass das erste Ende der Testvorrichtung in Kontakt mit dem Gemisch ist. Man lässt das Gemisch auf der Testvorrichtung wandern und inkubiert gleichzeitig das Ganze 2 Minuten lang bei 47 °C.

**[0094]** Die folgende Tabelle 1 gibt die Ergebnisse wieder, die für die 7 getesteten Proben erhalten wurden. Ein Intensitätswert von 0 bis 10 wird den detektierten Banden zugewiesen, wobei der Wert 10 für die intensivste Bande gegeben wird und der Wert 0 für die am wenigsten intensive Bande gegeben wird. Gemäß diesem Maßstab weist man der Referenzbande einen Wert 6 zu. Die Intensität des beobachteten Signals in der ersten Nachweisbande ist umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Penicillin G.

Tabelle 1

<u>Penicillin G</u>	<u>Intensität</u>	
<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
2	8	6
4	5	6
5	3	6
6	2	6
8	1	6
10	0	6

**[0095]** In diesem Beispiel wird, wenn die erste Bande eine geringere Intensität als diejenige der Referenzbande hat, der Test als positiv betrachtet. Die in der Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieser Test es ermöglicht, in 5 Minuten bis 4 ppb Penicillin G in einer Milchprobe nachzuweisen.

## 2.5.2. Test 2 – empfindlicher Test.

**[0096]** Man stellt sechs Milchproben her, die jeweils 0; 2; 2,5; 3; 4 und 5 ppb Penicillin G enthalten. Jede dieser Lösungen wird dann auf die folgende Weise analysiert.

**[0097]** Man entnimmt ein Aliquot von 200 µl Milchprobe und 32,8 µl in Beispiel 2.2.3. hergestellte Lösung B, die man in ein Eppendorf-Röhrchen gibt. Dieses Gemisch wird 5 Minuten lang bei 47 °C inkubiert. Man stellt dann eine Testvorrichtung vertikal in das Eppendorf-Röhrchen, so dass das erste Ende der Testvorrichtung in Kontakt mit dem Gemisch ist. Man lässt das Gemisch auf der Testvorrichtung wandern und inkubiert gleichzeitig das Ganze 2 Minuten lang bei 47 °C.

**[0098]** Die folgende Tabelle 2 gibt die Ergebnisse wieder, die für die 7 getesteten Proben erhalten wurden. Ein Intensitätswert von 0 bis 10 wird den detektierten Banden zugewiesen, wobei der Wert 10 für die intensivste

Banden gegeben wird und der Wert 0 für die am wenigsten intensive Bande gegeben wird. Gemäß diesem Maßstab weist man der Referenzbande einen Wert 6 zu. Die Intensität des beobachteten Signals in der ersten Nachweisbande ist umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Penicillin G.

Tabelle 2

<u>Penicillin G</u>	<u>Intensität</u>	
<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
2	7	6
2,5	5	6
3	4	6
4	1	6
5	0	6

**[0099]** In diesem Beispiel wird, wenn die erste Bande eine geringere Intensität als diejenige der Referenzbande hat, der Test als positiv betrachtet. Die in der Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieser Test es ermöglicht, in 7 Minuten bis 2,5 ppb Penicillin G in einer Milchprobe nachzuweisen.

Beispiel 3. Bestimmung von Antibiotika mit β-Laktamkern in der Milch mit BlaR.

**[0100]** Dieses Beispiel erläutert den Nachweis von Antibiotika mit β-Laktamkern, die von den Gesundheitsbehörden kontrolliert werden, in der Milch. Der in diesem Beispiel beschriebene Test verwendet den Rezeptor BlaR-CTD, gekoppelt an Goldkügelchen, die als Markierungsmittel dienen, und verwendet einen Träger, der in Form einer Testvorrichtung vorliegt, die einen festen Träger, auf dem Membranen fixiert sind, umfasst.

### 3.1. Kopplung von BlaR-CTD (Identifizierungsmittel) an die Goldkügelchen (Marker).

#### 3.1.1. Biotinylierung von BlaR-CTD.

**[0101]** 3,79 ml einer Lösung von Erkennungsmittel BlaR-CTD mit 6,6 mg/ml werden in Natriumphosphatpuffer 20 mM pH 7 aufgenommen. Man fügt dann zu dieser Lösung von BlaR-CTD 41,71 ml Bicarbonatpuffer (0,1 M an Natriumbicarbonat, pH 9) und 2 ml einer Lösung von 6-(Biotinamido)capronsäure-N-hydroxy-succinimidester mit 2,23 mg/ml ebenfalls in Bicarbonatpuffer hinzu. Diese Lösung wird langsam auf einem Rührer für Röhrchen auf einer Drehachse vom Typ LABINCO (erhältlich bei VEL, Belgien) mit einer Geschwindigkeit von 2 Umdrehungen/Minute 2 Stunden lang bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt gerührt. 2,5 ml einer Lösung von Tris-Puffer 1 M pH 8 werden mit dem Reaktionsgemisch 30 Minuten lang unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die so erhaltene Lösung wird gegen HNM-Puffer (Hepes 100 mM, pH 8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) 24 Stunden lang dialysiert. Auf diese Weise erhält man eine Lösung von biotiniertem BlaR-CTD, die man in HNM-BSA-Puffer (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml) bis auf eine Konzentration von 250 µg biotiniertem BlaR-CTD pro ml Puffer verdünnt. Diese Lösung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 3.1.2. Markierungsmittel.

**[0102]** Als Markierungsmittel verwendet man Goldpartikel mit einem Durchmesser von 40 nm, auf denen ein anti-Biotin-Antikörper aus der Ziege abgeschieden wurde, in Form von Suspensionen in einer wässrigen Natriumtetraboratlösung mit 2 mM bei pH 7,2, die durch Natriumazid 0,1%ig stabilisiert ist, (erhältlich bei BRITISH BIOCELL (Ref. GAB40)). Die optische Dichte dieser Suspensionen bei 520 nm beträgt etwa 10 und die Konzentration an Protein ist etwa 24 µg/ml.

#### 3.1.3. Kopplung von biotiniertem BlaR-CTD an die Goldkügelchen.

**[0103]** Die Lösung von biotiniertem BlaR-CTD, die in Beispiel 3.1.1. hergestellt wurde, wird 114,7-mal mit

HNM-BSA-Puffer (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml) verdünnt. Man mischt bei Raumtemperatur 22,5 Volumenteile dieser verdünnten Lösung von biotinyliertem BlaR-CTD, 7,5 Volumenteile HNM-BSA-Puffer, 9,27 Volumenteile Goldpartikelsuspension, die dazu dient, biotinyliertes BlaR-CTD zu markieren, und 6 Volumenteile Referenz-Goldpartikelsuspension (siehe folgendes Beispiel 3.1.4).

### 3.1.4. Unabhängige Referenz.

**[0104]** In diesem Test verwendet man ebenfalls eine Referenzsubstanz, die eine Bande liefert, deren Intensität es ermöglicht, schnell die Menge an Antibiotikum, das in der Probe vorhanden ist, quantitativ zu bestimmen.

**[0105]** Dazu verwendet man Goldpartikel von 40 nm, auf denen ein Anti-Kaninchen-Immunoglobulin-Antikörper aus der Ziege abgeschieden wurde. Diese Partikel sind bei BRITISH BIOCELL (Ref. GAR40) erhältlich in Form von Suspensionen in einer wässrigen Natriumtetraboratlösung mit 2 mM bei pH 7,2, die durch Natriumazid 0,1%ig stabilisiert ist. Die optische Dichte dieser Suspensionen bei 520 nm beträgt etwa 3 und die Konzentration an Protein ist etwa 6 µg/ml.

## 3.2. Fangsubstanzen.

### 3.2.1. Erste Fangsubstanz – Referenz-Antibiotikum.

**[0106]** 8 ml einer Lösung, die 213 mg menschliches Gammaglobulin (G4386, Sigma) und 8,6 mg 2-Iminothiolan Hydrochlorid (Aldrich, 33056-6) in Natriumcarbonatpuffer (100 mM, pH 9) enthält, werden eine Stunde lang bei 25 °C inkubiert.

**[0107]** Außerdem werden 20 ml einer Lösung, die 119,8 mg Cephalosporin-C und 54 mg Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (sSMCC, 22322 Pierce) in Natriumcarbonatpuffer (100 mM, pH 9) enthält, eine Stunde lang bei 25 °C inkubiert.

**[0108]** Die beiden zuvor hergestellten Lösungen werden dann gemischt. Man stellt den pH der resultierenden Lösung durch Zugabe von 3 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500 mM auf 7,1 ein und man inkubiert zwei Stunden lang bei 25 °C. Das nach Inkubation erhaltene Gemisch wird dreimal gegen 1 Liter Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5) dialysiert. Die resultierende Lösung wird über ein 0,22 µm-Filter filtriert und dann wird sie in gleiche Teile aufgeteilt und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

**[0109]** Bei der Verwendung werden die Aliquote aufgetaut und man fügt dazu einen Lebensmittelfarbstoff hinzu, bevor man die Abscheidung auf der Membran ausführt, um zu jedem Zeitpunkt die exakte Position der Abscheidung und die Qualität des Strichs zu beurteilen.

**[0110]** Die erste Fangsubstanz ermöglicht es, an die Goldkügelchen gekoppeltes BlaR-CTD, das in Bezug auf die Menge an in der Probe vorhandenem Antibiotikum im Überschuss vorhanden ist, zu fixieren.

### 3.2.2. Zweite Fangsubstanz – Substanz, die in der Lage ist, die unabhängige Referenz zu fixieren.

**[0111]** Für die zweite Fangsubstanz verwendet man eine Lösung von Kaninchen-Immunoglobulin (Sigma I 5006) mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml an Immunoglobulin in Natriumphosphatpuffer 10 mM, pH 7,5, menschliches Gammaglobulin 5 mg/ml. Diese zweite Fangsubstanz stoppt die unabhängige Referenz bei der Migration der Flüssigkeit auf der Testvorrichtung.

## 3.3. Testvorrichtung.

**[0112]** Man verwendet Testvorrichtungen, die die Membranen (2), (3) und (4) enthalten, die gemäß der in Beispiel 1.1. beschriebenen Arbeitsweise zusammengefügt sind. Die Membran (3) dieser Vorrichtungen trägt auf der nahen Seite die in Beispiel 3.2.1. beschriebene Fangsubstanz und auf der entfernten Seite die in Beispiel 3.2.2. beschriebene Fangsubstanz. Die Fangsubstanzen wurden gemäß dem in Beispiel 1.2. beschriebenen Verfahren abgeschieden.

## 3.4. Bestimmung der Antibiotika in der Milch.

## 3.4.1. Test in 3 Minuten – Schnelltest

**[0113]** Man stellt 7 Frischmilchproben her, die jeweils 0; 1; 2; 3; 4; 5 und 6 ppb Penicillin G enthalten. Jede dieser Lösungen wird dann auf die folgende Weise analysiert:

Man entnimmt ein Aliquot von 200 µl Milchprobe und 45,27 µl in Beispiel 3.1.3. hergestellte Lösung, die man in ein Glaskölbchen gibt. Dieses Gemisch wird 1 Minute lang bei 47 °C inkubiert. Man nimmt eine Testvorrichtung, die man vertikal in das Glaskölbchen stellt, so dass das erste Ende der Testvorrichtung in Kontakt mit dem Gemisch ist und dass das zweite Ende auf der Wand des Glaskölbchens aufliegt. Man lässt das Gemisch auf der Testvorrichtung wandern und inkubiert gleichzeitig das Ganze 2 Minuten lang bei 47 °C.

**[0114]** Die folgende Tabelle 1 gibt die Ergebnisse wieder, die für die 7 getesteten Proben erhalten wurden. Ein Intensitätswert von 0 bis 10 wird den detektierten Banden zugewiesen, wobei der Wert 10 für die intensivste Bande gegeben wird und der Wert 0 für die am wenigsten intensive Bande gegeben wird. Gemäß diesem Maßstab weist man der Referenzbande einen Wert von 6 zu. Die Intensität des beobachteten Signals in der ersten Bande ist umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Penicillin G.

Tabelle 1

<u>Penicillin G</u>	<u>Intensität</u>	
<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
1	9	6
2	9	6
3	4	6
4	0	6
5	0	6
6	0	6

<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
1	9	6
2	9	6
3	4	6
4	0	6
5	0	6
6	0	6

**[0115]** In diesem Beispiel wird, wenn die erste Bande eine geringere Intensität als diejenige der zweiten Bande hat, der Test als positiv betrachtet. Die in der Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieser Test es ermöglicht, in 3 Minuten weniger als 4 ppb Penicillin G in einer Milchprobe nachzuweisen.

**[0116]** Es wurden auch Versuche mit anderen Antibiotika mit β-Laktamkern unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dieser in 3 Minuten durchgeführte Test ermöglicht es, Amoxicillin bis 5 ppb, Ampicillin bis 5 ppb, Cloxacillin mit weniger als 10 ppb, Dicloxacillin mit weniger als 20 ppb, Oxacillin mit weniger als 20 ppb und Cephapirin bis 20 ppb in einer Milchprobe nachzuweisen.

## 1.3.2. Test in 5 Minuten

**[0117]** Man stellt 6 Frischmilchproben her, die jeweils 0; 2; 4; 6; 8 und 10 ppb Cloxacillin enthalten. Jede dieser Lösungen wird dann auf die folgende Weise analysiert.

**[0118]** Man entnimmt ein Aliquot von 200 µl Milchprobe und 45,27 µl in Beispiel 3.1.3. hergestellte Lösung, die man in ein Glaskölbchen gibt. Dieses Gemisch wird 3 Minuten lang bei 47 °C inkubiert. Man nimmt eine Testvorrichtung, die man vertikal in das Glaskölbchen stellt, so dass das erste Ende der Testvorrichtung in Kontakt mit dem Gemisch ist und dass das zweite Ende auf der Wand des Glaskölbchens aufliegt. Man lässt das Gemisch auf der Testvorrichtung wandern und inkubiert gleichzeitig das Ganze 2 Minuten lang bei 47 °C.

**[0119]** Die folgende Tabelle 2 gibt die Ergebnisse wieder, die für die 6 getesteten Proben erhalten wurden. Ein Intensitätswert von 0 bis 10 wird den detektierten Banden zugewiesen, wobei der Wert 10 für die intensivste Bande gegeben wird und der Wert 0 für die am wenigsten intensive Bande gegeben wird. Gemäß diesem Maßstab weist man der Referenzbande einen Wert von 6 zu. Die Intensität des beobachteten Signals in der ersten

Banden ist umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Cloxacillin.

Tabelle 2

<u>Cloxacillin</u>	<u>Intensität</u>	
<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
2	6	6
4	5	6
6	3	6
8	3	6
10	3	6

**[0120]** In diesem Beispiel wird, wenn die erste Bande eine geringere Intensität als diejenige der zweiten Bande hat, der Test als positiv betrachtet. Die in der Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieser Test es ermöglicht, in 5 Minuten bis 4 ppb Cloxacillin in einer Milchprobe nachzuweisen.

**[0121]** Es wurden auch Versuche mit anderen Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamkern unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dieser in 5 Minuten durchgeföhrte Test ermöglicht es, Penicillin G bis 3 ppb, Amoxicillin bis 4 ppb, Ampicillin bis 4 ppb, Dicloxacillin bis 8 ppb, Oxacillin bis 8 ppb, Cephapirin bis 16 ppb, Ceftiofur bis 100 ppb, Cefquinon mit weniger als 20 ppb, Nafcillin bis 20 ppb und Cefazolin bis 60 ppb in einer Milchprobe nachzuweisen.

**[0122]** Dieser Test eignet sich besonders gut als Auswahltest vor der Umfüllung der Milchfahrzeuge in die Silos.

### 1.3.3. Test in 9 Minuten

**[0123]** Man stellt 6 Frischmilchproben her, die jeweils 0; 4; 6; 8; 10 und 12 ppb Cephapirin enthalten. Jede dieser Lösungen wird dann auf die folgende Weise analysiert.

**[0124]** Man entnimmt ein Aliquot von 200  $\mu$ l Milchprobe und 45,27  $\mu$ l in Beispiel 3.1.3. hergestellte Lösung, die man in ein Glaskölbchen gibt. Dieses Gemisch wird 7 Minuten lang bei 47 °C inkubiert. Man nimmt eine Testvorrichtung, die man vertikal in das Glaskölbchen stellt, so dass das erste Ende der Testvorrichtung in Kontakt mit dem Gemisch ist und dass das zweite Ende auf der Wand des Glaskölbchens aufliegt. Man lässt das Gemisch auf der Testvorrichtung wandern und inkubiert gleichzeitig das Ganze 2 Minuten lang bei 47 °C.

**[0125]** Die folgende Tabelle 3 gibt die Ergebnisse wieder, die für die 6 getesteten Proben erhalten wurden. Ein Intensitätswert von 0 bis 10 wird den detektierten Banden zugewiesen, wobei der Wert 10 für die intensivste Bande gegeben wird und der Wert 0 für die am wenigsten intensive Bande gegeben wird. Gemäß diesem Maßstab weist man der Referenzbande einen Wert von 6 zu. Die Intensität des beobachteten Signals in der ersten Bande ist umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Cephapirin.

Tabelle 3

<u>Cephapirin</u>	<u>Intensität</u>	
<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
4	6	6
6	5	6
8	4	6
10	3	6
12	3	6

**[0126]** In diesem Beispiel wird, wenn die erste Bande eine geringere Intensität als diejenige der zweiten Bande hat, der Test als positiv betrachtet. Die in der Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieser Test es ermöglicht, in 9 Minuten bis 6 ppb Cephapirin in einer Milchprobe nachzuweisen.

**[0127]** Es wurden auch Versuche mit anderen Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamkern unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dieser in 9 Minuten durchgeführte Test ermöglicht es, Penicillin G bis 3 ppb, Amoxicillin bis 4 ppb, Ampicillin bis 4 ppb, Cloxacillin bis 4 ppb, Dicloxacillin mit weniger als 8 ppb, Oxacillin mit weniger als 8 ppb, Ceftiofur bis 80 ppb, Cefquinon mit weniger als 20 ppb, Nafcillin mit weniger als 20 ppb und Cefazolin bis 45 ppb in einer Milchprobe nachzuweisen.

**[0128]** Dieser in 9 Minuten durchgeführte Test ermöglicht es folglich, alle derzeit von den europäischen Behörden kontrollierten Antibiotika nachzuweisen und dies bis zu den von diesen Behörden vorgeschriebenen Gesetzesgrenzen.

#### 1.3.4. Test in 20 Minuten

**[0129]** Man stellt 6 Frischmilchproben her, die jeweils 0; 20; 30; 40; 50 und 60 ppb Ceftiofur enthalten. Jede dieser Lösungen wird dann auf die folgende Weise analysiert.

**[0130]** Man entnimmt ein Aliquot von 200  $\mu$ l Milchprobe und 45,27  $\mu$ l in Beispiel 3.1.3. hergestellte Lösung, die man in ein Glaskölbchen gibt. Dieses Gemisch wird 18 Minuten lang bei 47 °C inkubiert. Man nimmt eine Testvorrichtung, die man vertikal in das Glaskölbchen stellt, so dass das erste Ende der Testvorrichtung in Kontakt mit dem Gemisch ist und dass das zweite Ende auf der Wand des Glaskölbchens aufliegt. Man lässt das Gemisch auf der Testvorrichtung wandern und inkubiert gleichzeitig das Ganze 2 Minuten lang bei 47 °C.

**[0131]** Die folgende Tabelle 4 gibt die Ergebnisse wieder, die für die 6 getesteten Proben erhalten wurden. Ein Intensitätswert von 0 bis 10 wird den detektierten Banden zugewiesen, wobei der Wert 10 für die intensivste Bande gegeben wird und der Wert 0 für die am wenigsten intensive Bande gegeben wird. Gemäß diesem Maßstab weist man der Referenzbande einen Wert von 6 zu. Die Intensität des beobachteten Signals in der ersten Bande ist umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an Ceftiofur.

Tabelle 4

<u>Ceftiofur</u>	<u>Intensität</u>	
<u>(ppb)</u>	<u>1. Bande</u>	<u>2. Bande</u>
0	10	6
20	6	6
30	5	6
40	4	6
50	3	6
60	3	6

[0132] In diesem Beispiel wird, wenn die erste Bande eine geringere Intensität als diejenige der zweiten Bande hat, der Test als positiv betrachtet. Die in der Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieser Test es ermöglicht, in 20 Minuten bis 30 ppb Ceftiofur in einer Milchprobe nachzuweisen.

[0133] Dieser in 20 Minuten durchgeführte Test ermöglicht es folglich, alle derzeit von den europäischen und amerikanischen Behörden kontrollierten Antibiotika in einem einzigen Test nachzuweisen und dies bis zu den von diesen Behörden vorgeschriebenen Gesetzesgrenzen.

#### Beispiel 4. Verwendung einer Testvorrichtung in einem Plastikgehäuse.

[0134] Man verwendet eine Testvorrichtung, wie in Beispiel 1.6. beschrieben. In diesem Fall erfolgt das Inkontaktbringen der Probe mit der Testvorrichtung, indem man das inkubierte Gemisch in die Öffnung in Form einer Schale, die zu diesem Zweck vorgesehen ist, einbringt.

#### Patentansprüche

1. Testvorrichtung, die es ermöglicht, die Gegenwart von Analyten in einem flüssigen Milchprodukt durch tangentiale Kapillarmigration besagten Milchprodukts nachzuweisen, umfassend einen festen Träger (1), der ein erstes und ein zweites Ende besitzt, auf dem nacheinander, ausgehend von dem ersten Ende, aufgebracht sind

- eine Membran (2), die die Reinigung der analysierten Flüssigkeit ermöglicht,
- eine Membran (3), auf der eine oder mehrere Fangsubstanzen immobilisiert sind, und
- eine absorbierende Membran (4),

dadurch gekennzeichnet, dass die Membran (2) eine Leukosorb®-Membran ist, die aus nicht gewebten Polyesterfasern hergestellt ist und in der Lage ist, die in dem Milchprodukt vorhandenen Substanzen zurückzuhalten, die die Migration der gegebenenfalls in dem Milchprodukt vorhandenen Analyten und der gemäß dem praktizierten Verfahren verwendeten Nachweisreagenzien auf der Testvorrichtung verhindern, und dies bei der tangentialen Kapillarmigration der Probe nach Eintauchen des ersten Endes der Testvorrichtung in das analysierte Milchprodukt.

2. Testvorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran (3) eine Membran aus Nitrocellulose mit hoher Kapillargeschwindigkeit ist.

3. Testvorrichtung gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem eine Membran (5) besitzt, auf der wenigstens ein Nachweisreagenz abgeschieden wurde, wobei die Membran (5) vor der Membran (3) liegt.

4. Testvorrichtung gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen vollständig oder teilweise mit einem Plastikklebefilm (6) bedeckt sind.

5. Testvorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Plastikfilm (6) die ersten Millimeter der Testvorrichtung nicht bedeckt.

6. Testvorrichtung gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie in ein Plastikgehäuse eingebracht ist, das eine Öffnung in Form einer Schale oberhalb der Membran (2) und ein Öffnungsfenster oberhalb der Membran (3) aufweist.

7. Verfahren für den Nachweis von Analyten in einem flüssigen Milchprodukt, das eine Testvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Nachweisreagenzien verwendet, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) das Inkontaktbringen eines bestimmten Milchproduktvolumens mit der Testvorrichtung, wobei dieses Inkontaktbringen am ersten Ende der Testvorrichtung stattfindet,
- b) die tangentiale Migration durch Kapillarwirkung des Milchprodukts auf der Testvorrichtung, so dass die Analyten und die Nachweisreagenzien, die gegebenenfalls in dem Milchprodukt vorhanden sind, nach und nach die Membran (2), dann die Membran (3) durchlaufen und so dass die Bestandteile des Milchprodukts, die nicht von den Membranen (2) und (3) angehalten werden, in der Membran (4) enden und
- c) die Bestimmung einer Fixierung auf der Membran (3).

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweisreagenzien wenigstens eine Substanz, die in der Lage ist, den Analyten oder eine analoge Substanz dieses Analyten spezifisch zu erkennen, und wenigstens ein Markierungsmittel umfassen.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Substanz, die in der Lage ist, den Analyten oder eine analoge Substanz dieses Analyten spezifisch zu erkennen, an wenigstens ein Markierungsmittel gekoppelt ist.

10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Markierungsmittel fluoreszierend, partikelartig, radioaktiv, lumineszierend oder enzymatisch ist.

11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Nachweisreagenz vor dem Schritt a) hinzugefügt wird.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das vor dem Schritt a) hergestellte Gemisch unter Inkubationsbedingungen gehalten wird, die es einem der Nachweisreagenzien ermöglichen, einen stabilen und im Wesentlichen irreversiblen Komplex mit dem Analyten oder einer analogen Substanz dieses Analyten zu bilden.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweisreagenzien außerdem wenigstens eine Referenzsubstanz umfassen.

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ein Tetracyclin, Oxytetracyclin oder Chlortetracyclin ist.

15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt einerseits ein exogenes Protein des flüssigen Milchprodukts oder andererseits ein endogenes Protein des Milchprodukts ist.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ein Hormon ist.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt Progesteron oder das Wachstumshormon ist.

18. Verfahren gemäß Anspruch 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ein Antibiotikum mit β-Laktamkern ist.

19. Verfahren gemäß Anspruch 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicillin, Methylcillin, Cloxacillin, 6-APA, Monolaktam, Aztreonam, Mecillinam, Cephalexin, Cephaloglycin, Cephaloridin, Nitrocephin, Cefatoxim, Cefuroxim, Ceftiofur, Cephapyrin, 7-ACA.

20. Verfahren gemäß den Ansprüchen 7 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die in der Lage ist, den Analyten oder eine analoge Substanz des Analyten spezifisch zu erkennen, ausgewählt ist unter den Rezeptoren, die in der Lage sind, einen stabilen und im Wesentlichen irreversiblen Komplex mit dem Analyten oder einer analogen Substanz des Analyten zu bilden, und den spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern des Analyten oder einer analogen Substanz des Analyten.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die in der Lage ist, den Analyten oder eine analoge Substanz des Analyten spezifisch zu erkennen, ein Rezeptor ist, der aus einem Mikroorganismus erhalten wird, der gegen die Antibiotika empfindlich ist.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die in der Lage ist, den Analyten oder eine analoge Substanz des Analyten spezifisch zu erkennen, ein Rezeptor ist, der aus den Spezies *Bacillus*, *Streptococcus* oder *Actinomycetes* erhalten wird.

23. Verfahren gemäß den Ansprüchen 20, 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die in der Lage ist, den Analyten oder eine analoge Substanz des Analyten spezifisch zu erkennen, ein gegen die Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamkern empfindlicher Rezeptor ist, der aus *Bacillus licheniformis* erhalten wird.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der gegen die Antibiotika mit  $\beta$ -Laktamkern empfindliche Rezeptor, der aus *Bacillus licheniformis* erhalten wird, der Rezeptor BlaR oder der Rezeptor BlaR-CTD ist.

25. Testkit, umfassend eine Testvorrichtung gemäß den Ansprüchen 1 bis 6.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

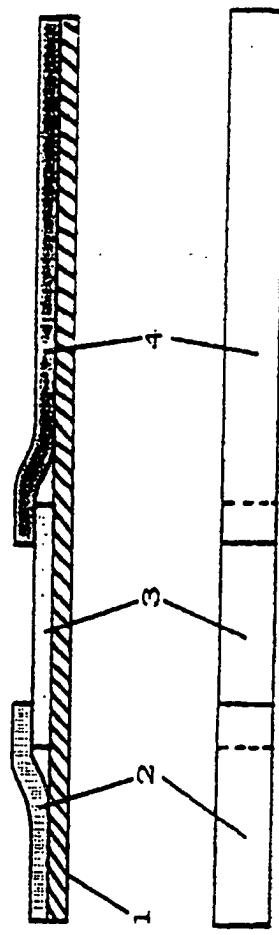
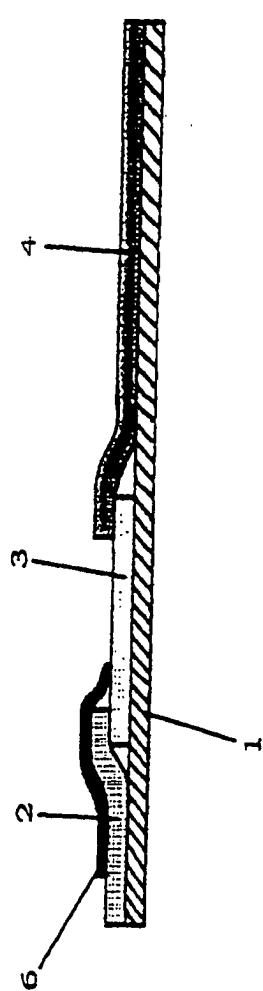


Fig. 1a

Fig. 1b

Figur 2



Figur 3

