

# Leitfaden zur Untersuchung auf Hemmstoffe

## 1 Allgemeines

Im Rahmen der Gütebewertung der Rohmilch für die Qualitätsbezahlung ist eine regelmäßige Untersuchung der Sammelmilch auf Hemmstoffe vorgeschrieben. Dabei werden mikrobiologische Verfahren eingesetzt, die auf einer Wachstumshemmung des Testkeims *Geobacillus stearothermophilus*<sup>1</sup> beruhen. Diese Verfahren werden als Agar-Diffusionsverfahren bezeichnet. Die Testsysteme, die in den AFEMA Ländern verwendet werden, sind unterschiedlich. Beispielsweise sind in Deutschland und Österreich der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT in verschiedenen Ausführungen) vorgeschrieben, in der Schweiz und in Italien werden zurzeit neben dem BRT auch der Delvotest SP und der CMT Copan Milk Test eingesetzt.

Da für das beschriebene Verfahren kein internationaler Standard zu Verfügung steht, wurde die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB enthaltene Methode L01.01-5 (1) der Bundesrepublik Deutschland als Grundlage herangezogen. Durch die Zugabe von Trimethoprim bzw. vergleichbaren Wirkstoffen zum Testsystem wird die Nachweisempfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden erhöht.

Die Probe enthält Hemmstoffe, wenn sie nach dem hier festgelegten Verfahren das Wachstum des Testkeims hemmt und damit ein Farbumschlag des Indikators unterbleibt.

## 2 Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt das Verfahren zum Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch auf Erzeugerebene mittels Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT), Delvotest und CMT Copan Milk Test. Der Testkeim weist eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Penicillinen auf, wobei die Nachweisgrenze für Benzylpenicillin mindestens 4 µg/kg beträgt.

Eine Identifizierung und Quantifizierung nachgewiesener Hemmstoffe ist nicht vorgesehen. Dieses Verfahren ist nicht als Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch unter Berücksichtigung der MRLs (Höchstmengen) gemäß Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 bestimmt. Unbeschadet dessen werden Tests zur Identifizierung empfohlen, um Informationen bei Streitfragen zur Verfügung zu haben.

Die Methode ist anwendbar auf Kuhmilch.

## 3 Kurzbeschreibung

Die Milchprobe wird auf ein in Kunststofftablets („Mikrotiterplatten“) abgefülltes Agarmedium gebracht. Das Agarmedium ist mit den Sporen des Testkeims *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* beimpft und enthält den Redoxindikator Brillantschwarz (BRT) bzw. den pH-Indikator Bromkresolpurpur (Delvotest, Copan Test). Anschließend wird das Testtablett bebrütet. Während der Bebrütung vermehren sich die Testkeime und bewirken, dass der Nährboden infolge des Indikatorumschlags die Farbe ändert. Beim BRT wird der Redoxindikator von der blauen Oxidationsstufe in die gelbe Reduktionsstufe übergeführt, beim Delvotest und beim Copan Test schlägt der pH-Indikator infolge der Säurebildung aus Glucose von violett auf gelb um. Sind in der Probe Substanzen enthalten, deren Wirkung

---

<sup>1</sup> Früher *Bacillus stearothermophilus*

einer Benzylpenicillin-Konzentration von mindestens 4 µg/kg (=Konzentration der Positivkontrolle) entspricht, wird das Wachstum des Testkeims gehemmt. Als Hemmstoffpositiv werden die Proben bewertet, bei denen das Medium mindestens den blauen bzw. violetten Farbton der positiven Kontrolle aufweist.

#### **4 Testsysteme**

Der Nachweis erfolgt prinzipiell mit kommerziell erhältlichen Testsystemen, wobei mehrere Testausführungen zur Verfügung stehen. Die Testsysteme sollten möglichst empfindlich gegenüber einer möglichst großen Zahl von Antibiotika und Sulfonamiden sein. Die Testsysteme sollen in den jeweiligen Ländern von den autorisierten Stellen zugelassen sein. Grundlage für die Zulassung ist eine Validierung des Testsystems nach ISO 13969/IDF 183 (2). Zur Absicherung der Ergebnisse kann dasselbe Testsystem auch in Ampullenform verwendet werden.

#### **5 Probenkonservierung und Probenlagerung**

Generell wird die Untersuchung aus einer nicht konservierten Probe durchgeführt. Unter bestimmten Umständen ist eine Untersuchung aus einer mit einem geeigneten Konservierungsmittel (z.B. Azidiol) stabilisierten Milch möglich. In diesem Fall muss zumindest die Negativkontrolle ebenfalls in der gleichen Konzentration als die Probe konserviert sein. Eine Konservierung der Positivkontrolle in der entsprechenden Konzentration wird empfohlen.

Die Proben sollen innerhalb von 36 Stunden bei einer Lagerung von maximal +8°C untersucht werden<sup>2</sup>. Eine Bestätigungsuntersuchung nach Punkt 7.5 bei positiven Ergebnissen muss unmittelbar nach dem Vorliegen des Ergebnisses der Erstuntersuchung erfolgen.

Nach der Untersuchung können positiv reagierende Proben für eventuell weitere Untersuchungen zwischen -30°C und -15°C tiefgefroren werden. Dabei ist zu beachten, dass eine nachteilige Beeinflussung der Probe ausgeschlossen ist (z.B. Schutz gegen Austrocknung, Lichtschutz). Eine Nachuntersuchung soll dabei so bald als möglich durchgeführt werden, um eine Inaktivierung von Hemmstoffen so gering als möglich zu halten. Tiefgefrorene Proben werden im Wasserbad bei ca. 45°C aufgetaut und vor dem Testansatz gründlich durchmischt.

#### **6 Reagenzien und Standards**

Alle Lösungen zur Herstellung der Reagenzien und Standards müssen Zimmertemperatur aufweisen.

Ein Bezug der unter diesem Punkt angeführten Reagenzien von kommerziellen Herstellern ist möglich. In diesem Fall muss die Übereinstimmung mit den angeführten Reagenzien und Standards mittels Zertifikat belegt werden. Die Anwendungshinweise der Hersteller sind zu beachten. Im Anhang ist die Herstellung der Reagenzien beschrieben, wenn keine gebrauchsfertigen Lösungen bezogen werden.

6.1 Benzylpenicillin-Milchstandard mit 4 µg Benzylpenicillin/kg Milch (Positivkontrolle). Die Lösungen sind gemäß Anhang zu entsorgen.

---

<sup>2</sup> Abweichend von § 64 LFBG ist eine Untersuchung innerhalb von 24 Stunden unter den derzeit üblichen Bedingungen nicht immer möglich.

6.2 Hemmstofffreies Substrat (Negativkontrolle): Vollmilch oder Magermilch gemäß Anhang.

6.3 Penicillinase-Lösung (optional) gemäß Anhang

6.4 p-Aminobenzoensäure (PABA) (optional) gemäß Anhang

## **7 Testdurchführung**

Bei der Testdurchführung sind die Anweisungen des Herstellers zu berücksichtigen.

7.1 Die Proben werden gründlich durchmischt.

7.2 Beimpfung

Die Abdeckfolie des Testtablets wird entfernt. Die einzelnen Kavitäten werden mittels einer geeigneten Pipette, Spritze oder eines Pipettiergerätes mit jeweils 0,1 ml der Probe beschickt. Beim Delvotest wird zusätzlich vor der Zugabe der Probe bzw. der Kontrollen eine Nährstofftablette in die Kavität verbracht (bei bestimmten Testausführungen ist dieser Zusatz nicht mehr notwendig). Auf jedem Testtablett wird mindestens eine Kavität mit 0,1 ml Penicillin-Milchstandard nach Punkt 6.1 als positive Kontrolle sowie mindestens eine weitere Kavität mit 0,1 ml hemmstofffreiem Substrat nach Punkt 6.2 als negative Kontrolle beschickt.

7.3 Bebrütung

Das mit den Proben und der Positiv- und Negativ-Kontrolle beschickte Testtablett wird mit Klebefolie fest verschlossen und vorzugsweise im Wasserbad oder im Heizblock bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur bebrütet (normalerweise 64-65°C). Beim Einbringen des Testtablets in das Wasserbad (Klebefolie nach oben) ist darauf zu achten, dass sich unterhalb des Tablets keine Luftblasen befinden und die Testtablets frei schwimmen. Bei der Bebrütung in einem Brutschrank ist ein Stapeln der Testtablets nicht zulässig. Zur Gewährleistung eines entsprechenden Wärmeaustausches ist ein Abstand zwischen den Tablets erforderlich. Die Bebrütung erfolgt so lange, bis bei der negativen Kontrolle nach Punkt 6.2 der Farbumschlag des Indikators eingetreten ist (etwa 2,5 Stunden, abhängig vom Testsystem und der Bebrütungstemperatur).

7.4 Auswertung

7.4.1 BRT

Nach beendeter Bebrütung werden die Proben durch Kippen des Testtablets nach vorhergehender Entfernung der Klebefolie abgegossen. Zur besseren Ablesung empfiehlt sich ein nachfolgendes Spülen mit Leitungswasser und anschließender Trocknung mittels Fließpapier. Die Reaktionen werden an der Plattenunterseite abgelesen. Negativ reagierende Proben sind am Farbumschlag des Redoxindikators von der blauen Oxidationsstufe in die gelbe Reduktionsstufe zu erkennen. Alle blau gefärbten Reaktionssysteme, die mindestens die Farbtintensität der positiven Kontrolle aufweisen, sind als hemmstoffpositiv zu bewerten.

7.4.2 Delvo-Test; Copan-Test

Nach beendeter Bebrütung werden die Reaktionen an der Plattenunterseite abgelesen. Negativ reagierende Proben sind am Farbumschlag des pH-Indikators von der violetten in die gelbe Stufe zu erkennen. Alle violett gefärbten Reaktionssysteme, die mindestens die Farbtintensität der positiven Kontrolle aufweisen, sind als hemmstoffpositiv zu bewerten.

7.4.3 Photometrische Auswertung

Neben der visuellen Beurteilung kann auch eine photometrische Auswertung erfolgen.

## 7.5 Bestätigung der Ergebnisse

Zur Bestätigung der Ergebnisse muss eine Wiederholung positiver Proben zumindest im Doppelansatz bei absolut verschleppungsfreier Beimpfung erfolgen. Für die Bewertung der Probe ist das Ergebnis der Bestätigungsuntersuchung entscheidend. Der pH-Wert der Probe ist im Falle der hemmstoff-positiven Bewertung zu ermitteln und bei Unterschreitung der vom Hersteller angegebenen pH-Werte ist von einer Bewertung der Probe abzusehen.

## 8 Identifizierung

Hemmstoffpositive Proben können mittels der hier beschriebenen Methoden weiter untersucht werden, um eine grobe Identifizierung der Hemmstoffe zu erhalten. Das Ergebnis der Identifizierung hat keinen Einfluss auf das nach Punkt 7.5 bestätigte hemmstoffpositive Ergebnis. Als Grundlage wurde die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG enthaltene Methode L01.01-42 (EG) bis 52 (EG) (3) herangezogen.

### 8.1 Identifizierung von penaselablen $\beta$ -Lactamantibiotika

Zu je 1 ml Probe werden je 40  $\mu$ l Penicillinase-Lösung nach Punkt 6.3 im Doppelansatz gegeben und 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt der Hemmstoffnachweis nach Punkt 7. Ein negatives Ergebnis weist auf das Vorhandensein penaselabiler  $\beta$ -Lactamantibiotika hin.

### 8.2 Identifizierung von Sulfonamiden – gemäß Müller (4)

Zur Identifizierung von Sulfonamiden werden zu je 1 ml Probe je 50  $\mu$ l PABA nach Punkt 6.4 im Doppelansatz gegeben und nach Durchmischung gemäß Punkt 7 untersucht. Ein negatives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von Sulfonamiden hin.

### 8.3 Identifizierung von milchoriginären Hemmstoffen

In der Milch können natürliche Hemmstoffe (z.B. Lactoperoxidase-System, Lactoferrin, Lysozym) vorhanden sein und positive Ergebnisse im Hemmstofftest bedingen. Diese werden durch Erhitzung zum Teil zerstört.

Zum Nachweis natürlicher Hemmstoffe wird je 1 ml Probe in ein Röhrchen im Doppelansatz ohne Benetzung der Glasinnenwand pipettiert und in einem Wasserbad 10 Minuten bei 80°C erhitzt. Dabei muss der Wasserspiegel mindestens 1,5 cm über dem Probenspiegel liegen. Nach Abkühlung der Probe im fließendem Wasser erfolgt der Hemmstoffnachweis gemäß Punkt 7. Ein negatives Ergebnis deutet auf das Vorhandensein natürlicher Hemmstoffe hin.

## 8 Dokumentation

Zu protokollieren sind mindestens:

- Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe
- Art und Datum der Probenahme
- Art der Konservierung
- Eingangs- und Untersuchungsdatum
- Testsystem mit Chargenbezeichnung
- Art der Positiv- und Negativkontrolle
- Ergebnis der Untersuchung
- Zeitpunkt und Ergebnis der Bestätigungsreaktionen
- Methodische Abweichungen und Begründung dafür

## **9 Mitgeltende Dokumente**

- (1) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG: Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch – Agar-Diffusionsverfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest). L01.01-5, Februar 1996.
- (2) International Standard Organisation: Milk and milk products – Guidance for the standardized description of microbial inhibitor tests. ISO/FDIS 13969/IDF 183: 2002
- (3) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG: Analyse- und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch. L01.00-42 (EG) bis 52 (EG), Dezember 1991.
- (4) Müller F.J. und Mitarbeiter (1990): Der Nachweis von Sulfonamid-Rückständen in Milch, Deutsche Milchwirtschaft, 41, 491-492.

## **10 History-Chart**

- Version 1.01 vom 13.01.2006, Originalversion

## Anhang

### Herstellung der Reagenzien

#### Benzylpenicillin-Standardlösungen

1. In einer verschließbaren, sterilen Flasche wird aus Natrium- oder Kalium-Benzylpenicillin und sterilem, destilliertem Wasser eine Benzylpenicillin-Standardlösung mit einer Konzentration von 1.000.000 µg/kg (entspricht 1mg/ml) hergestellt.  
  
100 mg Benzylpenicillin (MG=334,4) entsprechen 111,4 mg Kalium-Benzylpenicillin (MG=372,5) bzw. 106,6 mg Natrium-Benzylpenicillin (MG=356,4). Zur Herstellung der Lösung können daher 55,7 mg Kaliumsalz bzw. 53,3 mg Natriumsalz eingewogen und auf 50 ml aufgefüllt werden.
2. Aus 1 ml Benzylpenicillin-Standardlösung nach Punkt 1 wird durch Auffüllen mit sterilem, destilliertem Wasser auf 1.000 ml eine verdünnte Benzylpenicillin-Standardlösung mit einer Konzentration von 1.000 µg/kg hergestellt.
3. Aus 4 ml der verdünnten Benzylpenicillin-Standardlösung nach Punkt 2 und 6 ml sterilem, destilliertem Wasser wird eine Lösung mit einer Benzylpenicillin-Konzentration von 400 µg/kg hergestellt.
4. Aus 1 ml der verdünnten Benzylpenicillin-Standardlösung nach Punkt 3 wird durch Auffüllen mit hemmstofffreiem Substrat nach Punkt 6.2 auf 100 ml eine Lösung mit 4 µg/kg hergestellt („Milchstandard“).
5. Die in den Punkten 1 bis 4 erwähnten Benzylpenicillin-Standardlösungen dürfen nur am Tag der Herstellung verwendet werden und sollen bei maximal +6°C aufbewahrt werden. Es können kommerziell erhältliche lyophilisierte oder tiefgefrorene Milchstandards (Benzylpenicillin-Standardlösung nach Punkt 4) bezogen werden. Alternativ kann die Benzylpenicillin-Standardlösung nach Punkt 1 in Portionen aufgeteilt und zwischen -30°C und -15°C tiefgefroren werden. Die Verwendungsdauer der tiefgefrorenen Benzylpenicillin-Standardlösung muss durch entsprechende Prüfung abgesichert sein<sup>3</sup>.
6. **Entsorgung**  
  
Die Penicillinlösungen sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Vorschriften zu entsorgen.  
Empfehlung: Eine Inaktivierung des Penicillins ist durch Alkalisierung möglich. Dabei werden die Lösungen mittels NaOH-Plättchen auf einen pH-Wert von über 10 gebracht und über Nacht stehen gelassen.

---

<sup>3</sup> Benzylpenicillin ist im Vergleich zu anderen β-Lactamantibiotika relativ unempfindlich gegenüber Tieffrieren und Kühlung. Bei der Festlegung der Haltbarkeit muss die BRT-Version (unterschiedliche Nachweisgrenze für Benzylpenicillin), das hemmstofffreie Substrat (Vollmilch oder Magermilch) und die Lagertemperatur berücksichtigt werden. Zur Prüfung empfiehlt sich die Herstellung eines Milchstandards mit Benzylpenicillin-Konzentrationen von jeweils 2, 3, 4, und 5 µg/kg.

### **Hemmstofffreies Substrat**

1 Teil garantiert hemmstofffreies Magermilch- oder Vollmilchpulver (10 g) wird in 9 Teilen (90 g) sterilem, destilliertem Wasser unter Rühren gelöst.

Alternativ kann eine bei der Untersuchung als hemmstofffrei befundene Sammelmilch von mindestens 10 eutergesunden Kühen in normaler Laktation, die für höchstens 3 Tage bei maximal +6°C gelagert wird, verwendet werden. Zur Überprüfung der Hemmstofffreiheit können BRT-Testsysteme nach Punkt 2, der Delvo Test SP oder die Referenzmethode nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L01.00-11 der Bundesrepublik Deutschland verwendet werden. Im Unterschied zu dem hier beschriebenen Verfahren gilt beim BRT und Delvo-Test jede Probe als positiv, deren Farbton von der Negativkontrolle abweicht.

Die Verwendung kommerziell erhältlicher lyophilisierter Substrate ist möglich.

### **Penicillinase-Lösung**

Zur Identifizierung von Penicillinen wird Penicillinase (Penase) verwendet, die eine Spaltung des  $\beta$ -Lactamringes bewirkt. Die Penicillinase-Lösung wird soweit mit sterilem, destilliertem Wasser verdünnt, dass sich eine Konzentration von 1.000 Units (U)/ml ergibt. Diese Lösung, die vorzugsweise in Portionen abgefüllt werden sollte, darf höchstens 4 Wochen bei maximal +8°C aufbewahrt werden. Unbeschadet dessen ist die vom Hersteller angegebene Haltbarkeit zu berücksichtigen. Bei Bedarf wird die entsprechende Menge jeweils entnommen, wobei überschüssige Lösung nicht zurückpipettiert werden darf, sondern verworfen wird. Die Lösung muss klar sein; bei Trübung ist sie zu verwerfen.

Die Grundlage dieses Verfahrens ist, dass 10 U Penicillinase 0,6  $\mu$ g Penicillin inaktivieren.

Es können auch kommerziell erhältliche direkt einsetzbare Penicillinase-Lösungen verwendet werden, wenn durch ein Zertifikat belegt ist, dass ihre Anwendung dieselbe Wirkung belegt.

### **p-Aminobenzoensäure (PABA)**

Zur Identifizierung der Sulfonamide wird PABA mit einer Konzentration von 125  $\mu$ g / ml Probe zugesetzt. Zur Herstellung der Lösung werden 0,0250 g PABA in einem Schraubverschlussröhrchen eingewogen, mit 10 ml sterilem destilliertem Wasser versetzt und gut durchmischt. Die Lösung weist eine Haltbarkeit von einer Woche bei Lagerung bis maximal 6°C auf.