

## NACHWEIS VON HEMMSTOFFEN

Im weitesten Sinn versteht man unter Hemmstoffen Substanzen mit antimikrobieller Wirkung. Wenn aber von "Hemmstoffnachweis" gesprochen wird, meint man im Allgemeinen den Nachweis von Antibiotika, speziell von Penicillin. Die in der Milchwirtschaft eingesetzten Mikroorganismen sind sehr empfindlich gegenüber Penicillin. Milchproben mit einem pH-Wert <6,00 können zu einem hemmstoffpositiven Befund bei allen biologischen Nachweismethoden führen.

### Wachstumshemmung verschiedener Mikroorganismen nach OVERBY

Rein- oder Mischkulturen	Hemmende Konzentration von Penicillin (IE/ml)	
	teilweise	vollständig
<i>Lactococcus cremoris</i>	0,05 - 0,10	0,1 - 0,5
<i>Sc. thermophilus</i>	0,0017 - 0,17	0,25 - 0,05
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,3 - 0,6	
<i>Lb. bulgaricus</i>	0,3 - 0,6	0,1 - 0,3
<i>Lb. casei</i>	0,3 - 0,6	0,05 - 5,0
<i>Lb. helveticus</i>	0,3	0,1 - 0,5
<i>Lb. lactis</i>		0,05 - 0,3
<i>Leuconostoc mesent. sbsp. cremoris</i>	0,4 - 0,8	1,6
<i>Propionibacterium shermanii</i>	0,1	
Buttereikultur	0,017 - 0,17	
Käseisäurewecker	0,05 - 0,20	0,20 - 0,50

IE = Intern. Einheit Penicillin = 0,6 Mikrogramm Na-Benzyl-Penicillin  
(1 Milligramm = 1.670 IE, bei Procainderivaten des Penicillins ist 1 Mikrogramm = 1 IE)

**Hemmkonzentration** (teilweise Hemmung) **div. R + D-Mittel** für einen Käseisäurewecker

Mittel	Konzentration (in ppm)
Glutaraldehyd	5
Aldoquaternärer Komplex	5 – 10
QAV	10
Chlorhexidin	2 – 25
Ampholytseifen	70
Jodophore	10 – 25
Anionische Säuren	über 70

## 1.1 Papierscheibchenmethode nach Galesloot zur Feststellung von Penicillin in Milch (FIL-IDF 57: 1970)

Diese Methode ist für den qualitativen Nachweis von Penicillin bis zu 0,0025 IE/ml in Rohmilch, bearbeiteter flüssiger Milch, Magermilch und Trockenmilch anwendbar. Die Milch enthält Penicillin, wenn die Probe eine klare Hemmzone und eine Parallelprobe mit Zusatz von Penicillinase keine oder eine Hemmzone von geringem Durchmesser ergibt, wenn beide nach der folgenden Methode untersucht werden.

Das Verfahren beruht auf der Methode von TH. E. GALESLOOT und F. HASSING. Ein Filterpapierscheibchen wird mit der zu untersuchenden Milch getränkt und auf die Oberfläche eines Agarnährbodens aufgelegt, der mit dem besonders penicillinempfindlichen *Bac. stearothermophilus* beimpft ist. Die Bebrütung des Testorganismus bewirkt eine Trübung des Nährbodens. Das Vorhandensein von Hemmstoffen wird durch eine klare Zone rund um das Filterpapierscheibchen angezeigt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei **0,0025 IE/ml**.

1. **Standard-Penicillin-Lösung** von 100 IE/ml durch Lösen von Na- oder K-Benzylpenicillin in sterilem, dest. Wasser in einer sterilen Flasche herstellen. Diese Lösung soll nur am Tag der Herstellung verwendet werden und im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt werden.
2. **Verdünnen** der Standard-Penicillin-Lösung (0,1 / 0,01 / 0,005 / 0,0025 U/ml)
3. Penicillinase (**Penase**)-Lösung von 1.000 Einheiten/ml durch Lösen von Penase in sterilem dest. Wasser herstellen, im Kühlschrank bis längstens 2 Wochen aufbewahren
4. Der **Testkeim** *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 wird in St-I-Bouillon überimpft (10 ml Medium in 100 ml Kölbchen) und über Nacht bei 55 °C bebrütet.  
oder  
Testkeim aus der Ampulle verdünnen (2ml Suspension mit 38ml steriler Ringerlösung)
5. Für die **Herstellung der Platten** wird 1 ml der gut gewachsenen Kultur mit 5ml PCA-Agar vermischt. Die Schichtdicke soll 0,8 - 1mm betragen. Es dürfen nur Platten mit ebenem Boden verwendet werden. Besser ist es, wenn Medium und Kultur vorgemischt werden und dann erst die Platten gegossen werden.
6. **Versuchsaufbau:**  
Filterpapierscheibchen ( $\varnothing = 12-13$  mm) werden in die Milchprobe getaucht bis sie vollgesogen sind, dann werden sie an der Gefäßwand leicht abgestreift und auf die vorbereiteten Agarplatten gelegt. Jede Probe ist zumindest doppelt aufzubringen. Daneben ist auch eine Blindprobe, sowie eine Penicillinkontrollprobe aufzubringen.
7. Die Platten werden 2,5 Stunden bei 55 °C bebrütet. Nach der **Bebrütung** wird geprüft, ob sich ein Hemmhof gebildet hat.
8. Die **Gegenprobe mit Penase** dient zur Prüfung, ob der festgestellte Hemmstoff Penicillin ist. Hierzu werden 0,4 ml einer Penaselösung (1000 E/ml) mit 10 ml der zu testenden Milch vermischt und 30 Minuten bei 30 °C bebrütet. Anschließend wird der Test wie oben beschrieben durchgeführt.

## 1.2 Joghurt-Test nach FRANK

Die Milchprobe wird durch Erhitzen keimarm gemacht, mit Joghurt, Methylenblau und einem Wachsfaktor für *Streptococcus thermophilus* versetzt und bebrütet. Die Reduktion des Methylenblaus wird als Maß für eventuell in der Milch vorhandene Hemmstoffe gewertet. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei **0,01 IE/ml**.

1. Für die Herstellung der Verdünnungsflüssigkeit werden 10 g Glucose und 250 mg Calciumchlorid in 1000 ml dest. Wasser gelöst und 15 min. autoklaviert. Die Lösung wird dabei durch Karamelisierung der Glucose leicht bräunlich.
2. Für die Herstellung des Reaktionsgemisches werden 30 ml Joghurt und 1,2 ml Methylenblau (MB)-Stammlösung (0,5 %ige wässrige Lösung) direkt vor Bedarf in 200 ml der sterilen Verdünnungsflüssigkeit und Glaskügelchen kräftig geschüttelt. Das Gemisch ist bei Zimmertemperatur höchstens 30 min. haltbar.
3. Beim Ansetzen der Proben werden 10 ml Milch im Reagenzglas 5 min. auf 85°C erhitzt und im fließenden Wasser abgekühlt. Die Röhrchen müssen sauber, aber nicht steril sein und brauchen nicht verschlossen zu werden, da Luftinfektion nicht stört. Sie werden mit 2 ml Reaktionsgemisch beimpft und gut durchgemischt. Bebrütung 100 min. bei 43°C.

### 1.3 Brillantschwarz-Reduktionstest (BR-Test) §35 LMBG 01.0042-52(EG) Kap.VIII

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte sind mit einem Nährmedium gefüllt, welches Brillantschwarz als Redox-Indikator enthält. Im Nährboden ist auch der Testkeim (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) enthalten. Kann sich der Testkeim ungehindert entwickeln schlägt der Indikator von **blau** nach **gelb** um. Ist jedoch ein Hemmstoff vorhanden, ist kein Keimwachstum möglich und das Nöpfchen bleibt blau (=positiv).

Je 100 µl Milchprobe, hemmstofffreie Milch (Magermilch) und mit Penase behandelte Milch werden in je eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Bebrütung erfolgt schwimmend im Wasserbad oder in einem speziellen Wärmeblock mind. 2,5 Stunden bei 64 °C.

Beim **BR-AS-Test** (für Antibiotika und Sulfonamide) wird in eine Kavität zusätzlich 25µl wässrige-PABA (para-Aminobenzoessäure)-Lösung (5 µg/ml) und 100 µl Milchprobe einpipettiert. Da PABA die bakterizide Wirkung der Sulfonamide hemmt, kann zwischen antibiotika- und sulfonamidhaltigen Milch unterschieden werden.

### 1.4 Penzymtest

Der Penzymtest ist ein enzymatischer Farbschnelltest zum Nachweis von β-Laktam-Antibiotika (z.B. Penicillin). Das Enzym DD-Carboxipeptidase geht mit Penicillin einen stabilen Komplex ein, wodurch es unwirksam wird. Die Enzymaktivität wird überprüft. Dieses Enzym spaltet von einem künstlichen Substrat, das endständig 2 Alaninreste enthält, Alanin ab. Das Alanin wird in einer 2. Reaktion durch das Enzym Aminosäureoxidase in Brenztraubensäure übergeführt, wobei gleichzeitig Wasserstoffperoxid gebildet wird. Dieses oxidiert einen organischen Redoxindikator und es entsteht ein rosa Farbstoff. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca **0,017 IU/ml**. Der Test dauert ca. 20 Minuten.

### 1.5 Charm-Test

Der Charmtest ist ein sogenannter mikrobieller Rezeptortest. Die Rezeptoren (Bakterien, z.B. *Bac. stearothermophilus* oder Antikörper) werden der zu untersuchenden Milchprobe zugesetzt. Die Rezeptoren verbinden sich mit dem Antibiotikum. Anschließend werden radioaktiv markierte Rezeptoren der Probe zugegeben. Waren nun Antibiotika in der Probe, ist für die radioaktiv markierten Rezeptoren kein Bindungsplatz mehr frei und sie werden im Zuge der Probenaufbereitung wieder ausgewaschen. War die Milch hemmstofffrei, konnten sich die markierten Substanzen anlagern. Das Maß der Anlagerung kann durch Zählung der Strahlungsimpulse gemessen werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei **3-4 ppb Penicillin**.

## 1.6 Nachweis von Antibiotika mittels ELISA

Zum Nachweis von Antibiotika mittels ELISA werden üblicherweise Festphasentests eingesetzt, bei denen die Antikörper auf einer Mikrotiterplatte fixiert sind. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional der Antibiotikumkonzentration. Durch Aufstellung einer Eichkurve kann die Menge an Antibiotikum exakt bestimmt werden. Dieser Test wird z.B. zum Nachweis von Chloramphenicol eingesetzt.

