

# Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

## Basisinformationen und Hintergründe

### Was sind Hemmstoffe

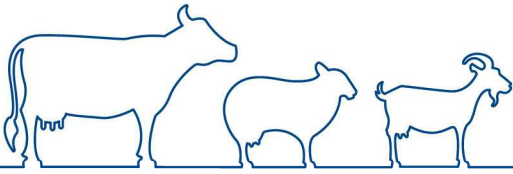
**Hemmstoffe** sind in der Milch vorkommende Substanzen, die bereits in geringen Mengen Mikroorganismen hemmen (bakteriostatische Wirkung) oder abtöten (bakterizide Wirkung). Hemmstoffe führen gerade bei der Erzeugung von fermentierten Milchprodukten immer wieder zu Fehlprodukten und verursachen damit in der Molkereiwirtschaft wirtschaftliche Verluste von beachtlicher Größenordnung. Zu den Hemmstoffen gehören vor allem Tierarzneimittel, Futtermittelinhaltsstoffe, Reinigungs- und Desinfektionsmittel und originäre Hemmstoffe.

### Was sind Antiinfektiva

Unter dem Begriff **Antiinfektiva** werden alle Substanzen zusammengefasst die zur Therapie von bakteriellen Infektionen eingesetzt werden. Hierzu zählen Antibiotika ( $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Tetracycline, Aminoglykoside u. a.) wie auch andere antibiotisch wirksame Substanzen (Sulfonamide u. a.).

In der Nutztierhaltung ist der **Einsatz von Antiinfektiva** zur Behandlung von Erkrankungen unerlässlich. Allerdings ist dabei zu beachten, dass behandelte Tiere die verabreichten Antiinfektiva über Harn, Kot und auch über die Milch unverändert wie auch in veränderter Form wieder ausscheiden. Gerade bei der **Mastitisbehandlung** werden Antibiotika und andere Antiinfektiva direkt ins Euter gegeben und somit auch mit der Milch ausgeschieden. Folglich ist während und für einen gewissen Zeitraum auch nach Abschluß einer Mastitisbehandlung mit Antiinfektiva eine Kontamination der Milch unvermeidbar.

Zum **Schutz des Verbrauchers** vor Hemmstoffen bzw. Antiinfektiva-Rückständen darf Milch entsprechend dem Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, LFGB (früher Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, LMBG) sowie durch die Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 nur dann in den Verkehr gebracht werden, wenn die festgelegten **Höchstmengen** (MRL = Maximum Residue Limit) in der Milch nicht überschritten werden.



Aus diesem Grund werden bei der Anwendung von Tierarzneimitteln **Wartezeiten** bis zur nächsten Milchablieferung im Rahmen des Zulassungsverfahrens der Tier- Arzneimittel festgesetzt (entsprechend AMG § 4). Nach Ablauf der Wartezeit darf der pharmakologisch wirksame Stoff die zulässige Höchstmenge nicht überschreiten.

Hemmstoffe und besonders Antiinfektiva in der Milch sind sowohl aus Sicht der Verbrauchergesundheit wie auch aus molkereitechnischer Sicht ein bedeutendes Problem. Sowohl die Milcherzeuger wie auch die milchverarbeitenden Unternehmen haben deshalb ein großes Interesse und auch die gesetzliche Verpflichtung, nur hemmstofffreie bzw. rückstandsfreie Milch und Milchprodukte in den Verkehr zu bringen.

Damit dies immer sicher gewährleistet ist, sind Kontrolluntersuchungen der Milch notwendig. Solche Untersuchungen werden von den Milcherzeugern, den milchverarbeitenden Betrieben sowie von unabhängigen oder staatlichen Kontrolllaboratorien durchgeführt. Hierfür werden standardisierte und zuverlässige Testmethoden eingesetzt.

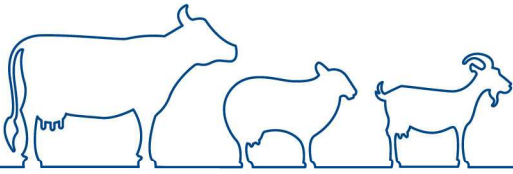
## Nachweis von Hemmstoffen und Antiinfektiva-Rückständen in Milch

Zum Nachweis von Hemmstoffen bzw. Antiinfektiva-Rückständen in Milch haben **mikrobiologische Hemmstofftestsysteme** weltweit die größte Bedeutung. Aufgrund geringer Kosten, technisch einfacher Durchführung, eines relativ breiten Nachweisspektrums und zum Teil kurzer Testdauer (z. B. 2-3 Stunden bei dem am weitesten verbreiteten Testkeim *Geobac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953, früher *B. stearothermophilus*) bieten sich mikrobiologische Hemmstofftest insbesondere für Routineuntersuchungen an.

## Testprinzip des mikrobiologischen Hemmstofftests

Mikrobiologische Hemmstofftestsysteme nutzen die Sensibilität ausgesuchter Mikroorganismen -sogenannter Testkeime- gegenüber Antibiotika, Sulfonamiden und anderen Hemmstoffen. Die Hemmstoffe verringern oder verhindern die Stoffwechselaktivität und somit die Vermehrung der Testkeime. Messparameter für die Vermehrung der Testkeime können die Keimdichte oder die Trübung der Medien sein. Zur Messung der Stoffwechselaktivität anhand von Farbumschlägen werden Säuerungs- und Reduktionsverfahren genutzt. Bei Säuerungsverfahren ändert sich aufgrund von sauren Stoffwechselprodukten der wachsenden Testkultur die Farbe des Indikators. Bei Reduktionsverfahren, hierzu zählt der Brillantschwarz-Reduktionstest, reduziert die wachsende Testkultur spezifische Indikatoren (z.B. Brillantschwarz), was ebenfalls zu einer Farbveränderung führt (z. B. von blau nach gelb). Die Aktivität kann aber auch durch den pH-Wert, den Säuregrad, den Milchsäuregehalt, die Dicklegungszeit, die Leitfähigkeit, u. a. gemessen werden.

Eines der bekanntesten und am weitesten verbreiteten Verfahren ist der **Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)**.



## Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) wurde erstmals 1967 durch KRAACK und TOLLE beschrieben und fand aufgrund seiner einfachen Handhabung und seiner Zuverlässigkeit sehr schnell eine weite Verbreitung in der milchwirtschaftlichen Praxis. Der BRT zeichnete sich durch seine Stabilität gegenüber verschiedenen Einflüssen aus. So können unterschiedliche Milchprodukte wie auch konservierte Milchproben mit dem BRT untersucht werden. Außerdem ist eine Automatisierung der Testdurchführung wie auch der Auswertung (photometrische Auswertung) im hohen Maß möglich. Der BRT wurde und wird seit seiner erstmaligen Publikation auf verschiedene Art und Weise modifiziert, mit der Zielsetzung, die Nachweisempfindlichkeit gegenüber ausgewählten Antiinfektiva-Rückständen zu verbessern, die Handhabung zu vereinfachen oder die Testgesamtdauer zu verkürzen.

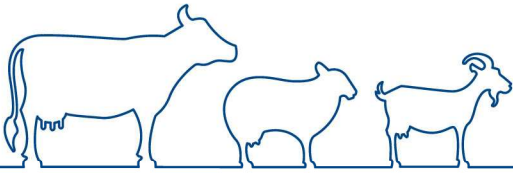
Die Erfahrungen mit dem BRT zeigen, dass dieser Test eine gut standardisierbare Methode darstellt. Der BRT hat sich international als anerkannte Standardmethode etabliert und findet nicht nur bei der Milch-Gütebezahlung seine Anwendung, sondern auch bei der Qualitätssicherung in Molkereien und bei Monitoring-Untersuchungen als Suchverfahren zum Nachweis von Antiinfektiva. Somit nimmt der BRT neben seiner Funktion als **BRT Hemmstofftest** auch in modifizierter Version als **BRT MRL-Suchtest** in der Routineuntersuchung seinen festen Platz ein.

## Testprinzip des Brillantschwarz-Reduktionstests

Bei dem BRT befindet sich das Testmedium in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten oder Ampullen. Dieses Testmedium enthält ein Gemisch aus Nährstoffen, Testkeimen (*Geobac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953), Brillantschwarz und weiteren Zusätzen zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit gegenüber ausgewählten Hemmstoffen. Die Milchproben werden in die Vertiefungen pipettiert. Eventuell vorhandene Hemmstoffe können anschließend in das Testmedium eindiffundieren. Während der Inkubation überführen die wachsenden Testkeime den Redoxindikator (Brillantschwarz) durch Spaltung zweier Azobindungen in seine gelbe bzw. farblose Reduktionsstufe; das Testmedium entfärbt sich von blau nach gelb. Sind Hemmstoffe in der Probe vorhanden, kommt es zu keinem oder nur einem geringfügigen Wachstum. Folglich bleibt eine Reduktion des Farbstoffes aus oder findet nur in eingeschränktem Maß statt; das Testmedium bleibt blau.

## Offizielle Methodenbeschreibung

Innerhalb der Europäischen Union wurden mit der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 europaweit einheitliche **Höchstmengen** (MRL = Maximum Residue Limit) für Tierarzneimittel-Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs und damit auch in der Milch festgelegt. Für den qualitativen Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Rohmilch und wärmebehandelter Milch wurde in der Entscheidung der Kommission



(91/180/EWG) ein mikrobiologischer Hemmstofftest beschrieben, der grundsätzlich den Testkeim *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enthalten muss. Ein solches Verfahren ist der Brillantschwarz-Reduktionstest.

In Deutschland ist der BRT 1982 zum Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch als offizielle Untersuchungsmethode in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG aufgenommen worden (heute § 64 LFGB). Diese Methode wurde im Februar 1996 geändert und in zwei unterschiedliche Methoden aufgliedert.

### **Methode L 01.01-5 Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch**

Dieses Testsystem dient dem Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch im Sinne der Milchgüteverordnung. Gemäß dieser Methode wird der **BRT (Hemmstofftest)** visuell ausgewertet, wobei alle Reaktionen, die mindestens den Farbton der Positiv-Kontrolle (Penicillin G 4 ng/ml) aufweisen, als hemmstoff-positiv zu bewerten sind.

### **Methode L 01.00-11 Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch**

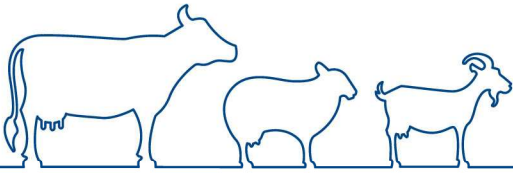
Mit der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 wurden **Höchstmengen (MRL = Maximum Residue Limit)** für Tierarzneimittel-Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs und damit auch in der Milch festgelegt. Deshalb enthält seit Februar 1996 die amtliche Sammlung neben dem BRT (Hemmstofftest) - Methode L 01.01-5 - auch ein Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch - Methode L 01.00-11 - (**MRL-Suchtest**). Abweichend vom Hemmstofftest werden beim MRL Suchtest zusätzliche Anforderungen an den BRT gestellt. Zur Erfassung möglichst vieler MRL wird das Nachweisspektrum des BRT (MRL-Suchtest) stetig erweitert. Hierfür gibt es mittlerweile verschiedene modifizierte BRT-Systeme, die neben speziell zusammengesetzten Testmedien (z. B. antagonistenarme Nährmedien) auch Zusätze (z. B. Trimethoprim, EGTA u. a.) enthalten, die die Wirkung von bestimmten Antiinfektiva verstärken. Verschiedene Antiinfektiva wie die Sulfonamide können im BRT farblich anders reagieren als die bisher übliche Positiv-Kontrolle (Penicillin G 4 ng/ml). Um auch diese Reaktionen richtig einzustufen, muss bei einer **Auswertung des MRL-Suchtests** von der Auswertung im Sinne der Methode L 01.01-5 abgewichen werden. Deshalb sind gemäß der amtlichen Methode L 01.00-11 beim **BRT (MRL-Suchtest)** alle Proben, die nicht die gelbe Reduktionsstufe der Negativ-Kontrolle aufweisen als positiv bzw. verdächtig zu beurteilen.

## **BRT-Systeme der Analytik in Milch GmbH**

Die AiM GmbH stellt Ihnen folgende BRT- Systeme zur Verfügung:

### **BRT Hemmstofftest**

Dieser Test wurde speziell für den Nachweis von Hemmstoffen in Milch entwickelt und zeichnet sich durch eine besonders hohe Sensitivität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-



Rückständen aus. Die durch die EU festgelegten Rückstandshöchst­mengen (MRLs) für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika werden mit dem BRT Hemmstofftest sicher erfasst (siehe folgende Tabelle). Aber auch andere Antibiotika und Sulfonamide werden nachgewiesen. Der BRT Hemmstofftest erfüllt speziell die Anforderungen der Milch-Güteverordnung in Deutschland, wird aber auch in anderen Ländern erfolgreich in der Gütebewertung und -bezahlung der Anlieferungsmilch eingesetzt. Er wird gemäß § 64 LFGB Methode L 01.01-5 und Entscheidung der Kommission 91/180/EWG hergestellt.

### **BRT MRL-Suchtest**

Der MRL-Suchtest ist ein modifizierter BRT, der sich durch eine gesteigerte Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika und Sulfonamiden auszeichnet. Der Test erfasst neben den festgelegten Höchst­mengen (MRL) für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auch Substanzen aus der Gruppe der Sulfonamide, der Makrolide und der Aminoglykoside auf MRL-Niveau. Weitere Substanzgruppen werden ebenfalls sensitiver als im BRT Hemmstofftest angezeigt (Siehe folgende Tabelle). Der MRL-Suchtest wird bei der Qualitätssicherung in Molkereien wie auch bei Monitoring-Untersuchungen als Suchverfahren zum Nachweis von Antiinfektiva eingesetzt. Er wird gemäß § 64 LFGB Methode L 01.00-11 und Entscheidung der Kommission 91/180/EWG hergestellt.

### **Weitere Informationsblätter**

**BRT – Produktinformation**

**BRT – Gebrauchsanweisung**

**BRT – Korrekte Inkubation**

**BRT – Visuelle Auswertung, Farbskala**

**BRT – Photometrische Auswertung**

**BRT – Konservierte Proben**

**Kontroll-Standards, lyophilisiert – Gebrauchsanweisung**

**Penicillinase – Produktinformation**

Sollten Sie noch Fragen haben oder spezielle Informationen benötigen, stehen wir Ihnen gerne persönlich zur Verfügung.