

Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

BRT Hemmstofftest BRT MRL-Suchtest BRT hi-sense

Agar-Diffusions-Verfahren zum Nachweis von Hemmstoffen und Tierarzneimittel-Rückständen in Milch und Milchprodukten

Gebrauchsanweisung

Der BRT wird wie folgt durchgeführt:

- Abdeckfolie von der Testplatte abziehen öffnen
- Jeweils 0,1 ml der Probenmilch in eine Kavität pipettieren (es empfiehlt sich der Doppelansatz)
- 0,1 ml der Negativ-Kontrolle (Hemmstofffreie Milch) in eine Kavität pipettieren
- 0,1 ml der Positiv-Kontrolle (Penicillin G Standard) in eine Kavität pipettieren
- Die Testplatten mit der geschlitzten Abdeckfolie verschließen
- Anschließend die Testplatte im Wasserbad oder Thermoblock bei 65 °C bebrüten bis die Negativ-Kontrolle gelb entfärbt ist (BRT Hemmstofftest ca. 2:15 h +/- 15 min, BRT MRL-Suchtest ca. 2:30 h +/- 15 min, BRT hi-sense ca. 3:30 h +/- 30 min)
- Die Milch kann zur Auswertung abgeschüttet werden
- Die Testreaktionen werden an der Plattenunterseite abgelesen

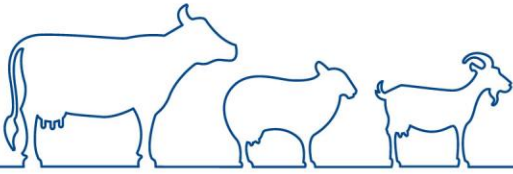
Mit Streifenplatten oder Teströhrchen bzw. Single 48 Teströhrchen ist entsprechend zu verfahren. Der Test ist standardisiert und jede Charge wird unter den beschriebenen Bedingungen geprüft. Wird von diesem Schema abgewichen, kann keine Gewähr für korrekte Testergebnisse gegeben werden. Siehe auch „BRT-Gebrauchsanweisung“

Die Hemmstofftestsysteme BRT Hemmstofftest, BRT MRL-Suchtest und BRT hi-sense werden gemäß § 64 LFGB Methoden L 01.00-11, L01.01-5 und Entscheidung der Kommission 91/180/EWG hergestellt.

Analytik in Milch
Produktions- und Vertriebs- GmbH
Kaiser-Ludwig-Platz 2
D-80336 München

Kontakt
Telefon +49 89 5307512-0
E-Mail info@aim-bayern.de
Internet www.aim-bayern.de





Wichtige Hinweise für die Durchführung

Lagerung und Haltbarkeit

Der Brillantschwarz-Reduktionstest muss nach Erhalt bei 6 – 10 °C kühl gelagert werden. Unter diesen Bedingungen ist der BRT mindestens 4 Monate ab Produktion haltbar (BRT ESL 9 Monate; BRT single 48 / Röhrchen 12 Monate). Durch eine lange Lagerung kann sich die Inkubationsdauer verlängern (je nach Lagerungsdauer ca. 15 - 30 Minuten). Die Nachweisempfindlichkeit wird aber auch durch lange Lagerung nicht negativ beeinflusst.

Probenmaterial

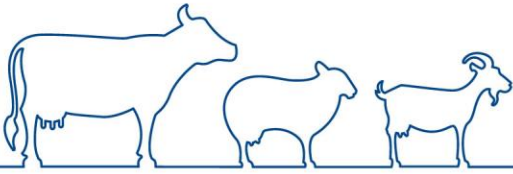
Die zu untersuchenden Milchproben sollen qualitativ einwandfrei sein, verkehrsfähiger Milch entsprechen und sobald als möglich untersucht werden. Verunreinigte Proben, saure Milchproben (pH <5,8) und Proben mit stark erhöhter Keim-/ Zellzahl sind nicht zur Untersuchung geeignet. Bei kurzzeitiger Aufbewahrung reicht eine Lagertemperatur von 6 – 10 °C aus; für eine längere Lagerung sollte das Material bei -15 bis -30 °C eingefroren werden. Damit wird die Inaktivierung von Rückständen verhindert. Derartig gelagerte Proben werden im Wasserbad bei 45 °C aufgetaut und unmittelbar vor der Untersuchung gründlich vermischt.

Kontrollen / Standards

Im Rahmen der guten Laborpraxis ist der Ansatz von Positiv- und Negativ-Kontrollen bei der Hemmstoffuntersuchung unerlässlich. Damit wird nicht nur die Anforderung der offiziell beschriebenen Methode erfüllt, sondern auch der Qualitätssicherung entsprochen und eine Vielzahl an Vorteilen für den Anwender geschaffen. Der Endzeitpunkt der Inkubation ist durch den Farbumschlag der Negativ-Kontrolle nach gelb eindeutig bestimmt. Die richtige Reaktion der Positiv- und Negativ-Kontrolle gibt dem Anwender die Sicherheit, dass der Test richtig reagiert hat und verifiziert somit die Ergebnisse, der im gleichen Ansatz untersuchten Proben. Die Interpretation der Testergebnisse wird durch den Vergleich von Proben und Kontrollstandards deutlich erleichtert. Die Negativ- wie auch Positiv-Kontrollen sollten immer gleichartig wie das zu untersuchende Probenmaterial zusammengesetzt sein. Dadurch werden die Einflüsse des Untersuchungsmaterials auf das Testsystem mit berücksichtigt.

Die **Hemmstofffreie Milch** wird im BRT als Funktions-Kontrolle bzw. Negativ-Kontrolle eingesetzt. Die Hemmstofffreie Milch wird als Lyophilisat geliefert muss vor Gebrauch entsprechend der Gebrauchsanweisung resuspendiert werden und kann dann direkt in ein Nöpfchen einpipettiert werden. Das mit Hemmstofffreier Milch beimpfte Nöpfchen muss während der Bebrütung von blau nach gelb entfärben.

Der **Penicillin G Standard** dient als Positiv-Kontrolle. Der Penicillin G Standard wird als Lyophilisat geliefert, muss vor Gebrauch entsprechend der Gebrauchsanweisung resuspendiert bzw. verdünnt werden und kann dann direkt in ein Nöpfchen einpipettiert werden. Dieses Nöpfchen muss nach der Bebrütung blau sein.



Die **Penicillinase** kann zur Identifizierung von penicillinaselablen Penicillinen eingesetzt werden. Die Penicillinase wird gebrauchsfertig als Lösung geliefert und kann wie folgt angewendet werden:

10 µl der Penicillinase werden in ein Nöpfchen des BRT pipettiert. Dazu werden 0,1 ml der zu prüfenden hemmstoff-positiven Probe gegeben. Nach der Bebrütung zeigt das betreffende Nöpfchen bei einer Kontamination der Milchprobe mit penicillinaselablen Penicillinen/ β -Lactam Antibiotika eine negative Reaktion (gelber Farbton), bei anderen Hemmstoffen eine positive Reaktion (blauer Farbton). Die beschriebene negative Reaktion beweist eindeutig das Vorhandensein von Penicillinen/ β -Lactam Antibiotika in der Milchprobe.

Verunreinigungen können die Lösungen bzw. die Hemmstofffreie Milch unbrauchbar machen bzw. zu falschen Ergebnissen führen. Deshalb muss mit den Kontrollen stets sauber und sorgfältig gearbeitet werden.

Verschluss der Testeinheiten

Die Testplatten bzw. Streifen oder Röhrchen sollten vor dem Einbringen in das Wasserbad verschlossen werden, BRT single 48 Röhrchen werden offen bebrütet (Ausnahme im Wasserbad). Dringt Wasser in die Reaktionssysteme ein, kann die Testreaktion verfälscht werden.

Bebrütung

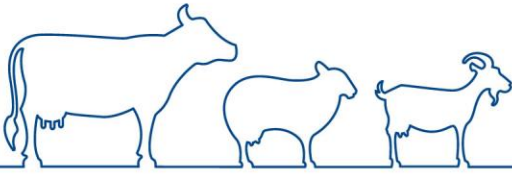
Die Bebrütung kann im **Wasserbad**, **Thermoblock** oder im **Brutschrank** erfolgen. Das Wasserbad oder der Thermoblock sind grundsätzlich zu bevorzugen, da die Temperaturübertragung direkter und die Wärmeverteilung gleichmäßiger ist als im Brutschrank. Wichtig ist bei allen Methoden, dass die Temperatur konstant gehalten wird und keine großen Abweichungen (zeitlich wie auch räumlich) von der eingestellten Temperatur auftreten.

Bebrütungstemperatur

Die optimale Bebrütungstemperatur beträgt in Wasserbad und Thermoblock jeweils 65 °C. Im Brutschrank muss die Temperatur je nach Gerätetyp individuell eingestellt werden und kann 65 – 69 °C betragen. Auf Grund der einfacheren und zuverlässigeren Temperatureinstellung empfehlen wir Wasserbad oder Thermoblock. Weicht die Bebrütungstemperatur von den idealen 65 °C (im Testsystem gemessen) ab, verlängert sich die Inkubationsdauer erheblich (30 Minuten und länger).

Bebrütungsdauer

Die Bebrütungsdauer ist abhängig von der eingestellten Temperatur wie auch von der konstant gleichen Wärmeverteilung. Bei idealen Bedingungen beträgt die Inkubationsdauer des BRT Hemmstofftest ca. 2:15 h +/- 15 min, des BRT MRL-Suchtest ca. 2:30 h +/- 15 min und des BRT hi-sense ca. 3:30 h +/- 30 min. Auf Grund unterschiedlicher Lagerungsdauer und sonstiger Bedingungen kann sich die Inkubationsdauer verlängern. Der Test muss so lange bebrütet werden, bis die Negativ-Kontrolle vollständig entfärbt ist.



Auswertung

Eine korrekte Auswertung kann grundsätzlich nur dann erfolgen, wenn auf der Testplatte bzw. Streifenplatte oder mit den Teströhrchen jeweils mindestens eine Positiv- und Negativ-Kontrolle mitgeführt wurden und diese korrekt reagiert haben.

In Deutschland sind zwei Interpretationen der Ergebnisse festgelegt worden:

Untersuchungen gemäß **Milchgütebezahlung** (Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch gemäß amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Methode L 01.01-5) werden wie folgt ausgewertet:

- Alle Reaktionssysteme die mindestens die Farbintensität der Positiv-Kontrolle (Penicillin G Standard) aufweisen, sind als positiv zu bewerten.

Untersuchungen gemäß dem **Lebensmittelrecht** (Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch gemäß amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Methode L 01.00-11) werden wie folgt ausgewertet:

- Alle Reaktionssysteme die einen Farbton aufweisen, der eindeutig von dem Farbton der Negativ-Kontrolle unterscheidbar ist, werden als positiv bzw. verdächtig bezeichnet.

BRT Testsysteme können sowohl visuell als auch instrumentell ausgewertet werden. Nach Eignungsprüfung sind instrumentelle Auswertungsmethoden (z.B. photometrische Auswertung) zur Unterstützung der visuellen Auswertung zulässig.

Für weitere Informationen sprechen Sie uns bitte an. Wir sind Ihr kompetenter Partner und beraten Sie gerne persönlich telefonisch oder per E-Mail.