

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Nährmedienbereitstellung für die Durchführung des "Dreiplattentests"

Stellungnahme des BfR vom 14. Mai 2003

Die Untersuchung von Lebensmitteln auf mögliche Rückstände von Antibiotika, Sulfonamiden und anderen Stoffen mit antimikrobieller Wirkung wird trotz wesentlicher Fortschritte auf dem Gebiet der Analytik noch größtenteils mit biologischen Testsystemen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Systeme werden nicht die Wirkstoffe selbst detektiert und identifiziert, sondern es wird deren bakterienhemmende Wirkung nachgewiesen.

Bei der amtlichen Fleischuntersuchung und der Einfuhruntersuchung frischen Fleisches ist der "Dreiplattentest" einzusetzen, ein Agardiffusionstest mit *Bacillus subtilis* BGA als Testkeim (Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung nach dem Fleischhygienegesetz und dem Geflügelfleischhygienegesetz - AVVFIH). Enthält eine auf dieses Testsystem aufgebrachte Probe eine antibiotisch wirkende Substanz, so diffundiert diese in das Nährmedium. In der Umgebung der Probe wird der Testkeim am Wachstum gehindert, er bildet dort keine Kolonien aus, es entsteht eine Hemmzone.

In der Vergangenheit hat es wiederholt Probleme mit der Bereitstellung geeigneter Nährböden für die Durchführung des Dreiplattentests gegeben. Zuletzt war offenbar die Auswahl der verwendeten Peptone für diese Schwierigkeiten verantwortlich. Das BfR hat deshalb einen Hersteller von Nährmedien für die Mikrobiologie (OXOID, Wesel) gebeten, bei der Herstellung des für die amtliche Untersuchung von Fleisch auf Hemmstoffe vorgeschriebenen Testmediums bestimmte Peptone zu verwenden, die auf Grund ihrer Zusammensetzung einen Hinweis auf ihre Eignung erlaubten. Die schließlich zu einer erweiterten Prüfung freigegebene Rezeptur entspricht in ihrer Zusammensetzung den in der AVVFIH genannten Anforderungen zur Durchführung der Untersuchung auf Hemmstoffe in Muskulatur, Niere und Leber. Das hierbei verwendete Fleischpepton wurde allerdings in Abweichung von der AVVFIH nicht durch tryptische, sondern durch peptische Verdauung gewonnen.

Das neue Nährmedium ist durch die Untersuchungseinrichtungen der Länder und das BfR auf seine Eignung, insbesondere gegenüber Sulfonamiden, getestet worden.

Für einen Eignungstest im BfR wurde dieses Medium entsprechend den Angaben der AVVFIH angesetzt. Nach pH-Einstellung auf drei unterschiedliche pH-Bereiche (pH 6,0; 7,2; 8,0) mit NaOH bzw. HCl erfolgte der Zusatz von *Bac. subtilis* BGA, bei dem auf pH 7,2 eingestellten Nährboden auch von Trimethoprim (TMP), und die Herstellung von Agar-Testplatten. Auf diese wurden zur Testung bestimmte Wirkstoffe (pH 6,0: Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Penicillin, Furazolidon; pH 7,2+TMP: Sufadimethoxin, Sulfadoxin, Sulfamidin, Trimethoprim; pH 8,0: Dihydro-Streptomycin, Enrofloxacin, Erythromycin, Spiramycin) mittels Testblättchen aufgebracht.

Bei der Prüfung wurde der neue Agar mit einer Agarcharge aus der Nährbodensammlung des BfR als sogenannter „Gold-Standard“ verglichen. Die „BfR-Agarcharge“ wurde ausgewählt, weil hierbei die Leistungsparameter (mit dem Teststamm *Bac. subtilis* BGA) gegenüber ausgewählten Wirkstoffen dem BfR durch regelmäßige eigene Prüfungen bekannt sind.

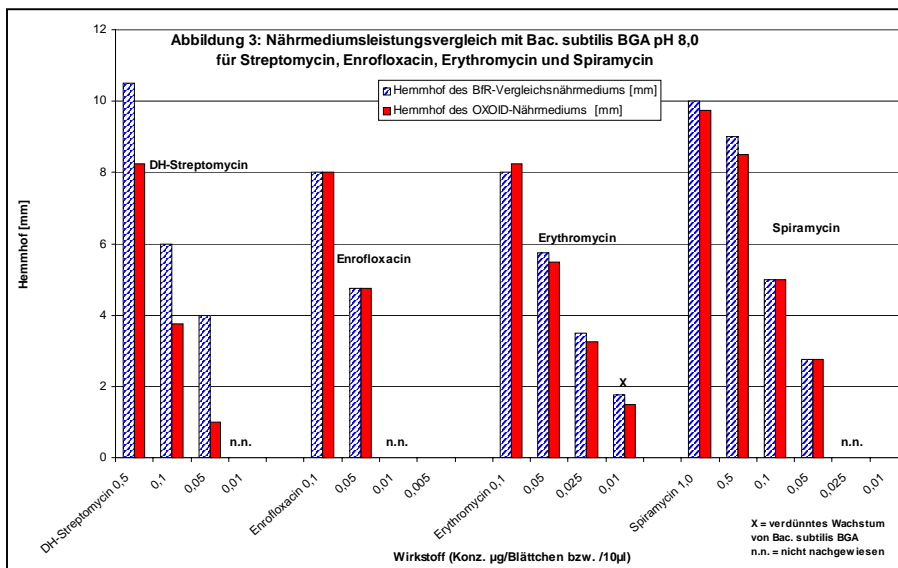
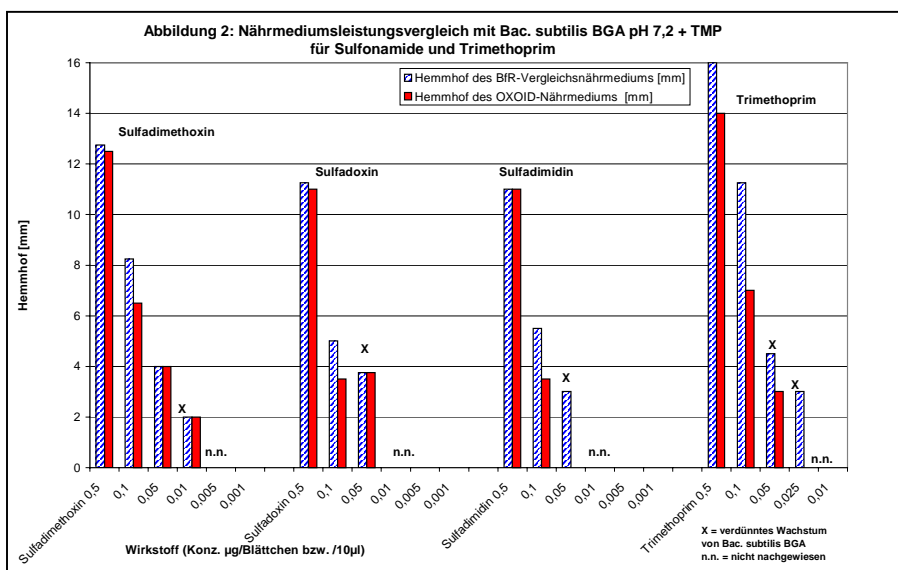
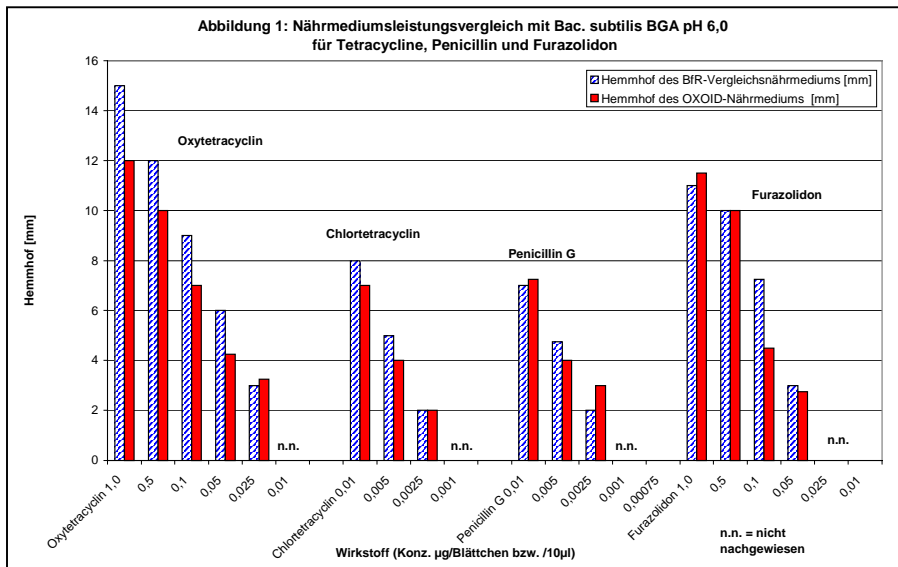
Die Ergebnisse der Prüfung des Nährmediums sind für die pH-Bereiche getrennt in den Abbildungen 1-3 dargestellt. Die Empfindlichkeit des Dreiplattentests (mit *Bac. subtilis* BGA) erreicht mit dem neuen Medium nicht bei allen Wirkstoffen die gleich hohen Werte, die mit dem BfR-Vergleichsmedium erreicht werden. Diese leicht geringere Empfindlichkeit war auch bei

den in der Vergangenheit im Handel befindlichen Chargen zu beobachten. Lediglich für Streptomycin blieb die Empfindlichkeit des Testsystems mit dem neuen Nährmedium deutlich hinter dem Vergleichsmedium zurück, das Hemmhofergebnis lag aber noch im vorgeschriebenen Toleranzbereich von 8-10 mm.

Die Ergebnisse der Prüfung zeigen, dass das neue Nährmedium für den Einsatz im Dreiplattentest gemäß der AVVFIH geeignet ist.

Aufgrund der Erfahrungen aus früheren Untersuchungen weist das BfR darauf hin, dass die verschiedenen Chargen der jeweils kommerziell erhältlichen Nährmedien eine große Bedeutung für das Testergebnis haben können. Daher ist die Eignungsprüfung jeder neuen Nährmedien-Charge im Untersuchungslabor von großer Bedeutung für die routinemäßige Durchführung des Dreiplattentests. Zusätzlich sollten Hersteller die Anwender über Änderungen der Rohstoffe für ihre Rezepturen informieren.

Über beobachtete Änderungen der Empfindlichkeiten bei der Qualitätskontrolle sollten die betroffenen Untersucher unverzüglich (unter Angabe von Untersuchungsbedingungen und Charge) alle übrigen Untersuchungseinrichtungen in Deutschland und das BfR informieren, um durch zentrale Abstimmung der Mängel eine einheitlich qualitativ befriedigende Anwendung des Dreiplattentests zu gewährleisten.



Nach Angaben des Herstellers, OXOID, Wesel, soll der Test in Kürze im Handel erhältlich sein.