

Instrumentelle Auswertung von mikrobiologischen Hemmstofftests mit Indikator in Mikrotiterplatten

Von G. Suhren und H.-G. Walte

Institut für Hygiene und Produktsicherheit der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, Postfach 60 69, 24121 Kiel

1. Einleitung

Die Auswertung der in der Praxis weitverbreitet eingesetzten mikrobiologischen Hemmstofftests mit Indikator erfolgt überwiegend durch subjektive visuelle Auswertung in 1-4 Stufen. Für Methodenentwicklung, -validierung und für objektive Ablesung sind instrumentelle Auswertesysteme, die eine feinere Ablesung mit Messwertskala und auch eine Dokumentation der Ergebnisse ermöglichen, wünschenswert. Für diesen Zweck wurden photometrische Verfahren mit ELISA-Readern entwickelt (1-3). Mit der Weiterentwicklung der mit Hilfe der Scannertechnologie möglichen Farbmessung wird von Testkitherstellern^{1,2} den Anwendern Software für die Auswertung der Testplatten bzw. -ampullen zur Verfügung gestellt, mit der die Farbe des Indikators durch einen Algorithmus aus den drei Koordinaten L*=Helligkeit, a*=rot-grün-Buntheit und b*=gelb-blau-Buntheit bestimmt wird. Die verwendeten Formeln sind unterschiedlich und von den Testkitherstellern nicht offengelegt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Z-(DSM) bzw. als Cif-Werte (Copan). Über erste Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

2. Material und Methoden

Mikrobiologische Hemmstofftests

Delvo MCS¹, BR-AS spezial¹ und Copan CMT²

Auswertung

Visuell: 1=negativ, 2=leicht verdächtig, 3=verdächtig, 4=positiv

Relativierte Absorption in % (2)

Farbmessung mit Scannern: Kalibrierung mit Farbkarte IT8.7/2 gemäß ISO 12641, Angabe in Z-(DSM) bzw. Cif-Werten (Copan), vorgeschlagene Grenzwerte: ≥ 0 (Z-Werte) bzw. 4,5 (Cif-Werte)

¹ DSM Food Specialities, Delft/NL

² Copan, Brescia/IT

Dotierte Milchproben
Herstellung nach ISO 13969/IDF 183

Proben aus Behandlungsversuchen („incurred“)

An Mastitis erkrankte Kühe (Holstein Schwarzbunte) der Versuchstation Schädtkbek, Behandlung mit Procain Penicillin G 3 Mio® (PEN) bzw. Peracef® (Cefoperazon CPZ)

Quantitative Bestimmung mit HPLC-Methoden (5)

	PEN	CPZ
Nachweisgrenze (µg/kg)	<1	<1
Quantifizierungsgrenze (µg/kg)	1	<10
Wiederfindung in % (MRL-Niveau)	64	50

3. Ergebnisse und Diskussion

Negative und positive Kontrollproben

An sieben verschiedenen Untersuchungstagen wurden je acht Testtablets verwendet; auf jeder Mikrotiterplattlet wurden negative und positive (4 µg PEN/kg) lyophilisierte Kontrollproben einer HerstellungschARGE analysiert. Die Ergebnisse der instrumentellen Auswertung sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die Messwerte der negativen und positiven Kontrollproben unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der vorgeschlagenen Grenzwerte von 0 (Z-Wert) bzw. 4,5 (Cif-Wert); in keinem Fall wurden „falsch“ positive bzw. negative Ergebnisse ermittelt. Die Variation der Messwerte an den verschiedenen Untersuchungstagen – ausgedrückt durch die Variationskoeffizienten in % – sprechen dafür, dass mit allen Testsystemen konsistente Ergebnisse ermittelt werden.

Tab.1: Absorption und Z- bzw. Cif-Werte von lyophilisierten Kontrollproben (7 Untersuchungstage, 8 Platten pro Test)

	Delvo MCS		BR-AS spezial		Copan CMT	
	Absorption	Z-Werte	Absorption	Z-Werte	Absorption	Cif-Werte
Negative Kontrollprobe						
XQ	0,27	-7,19	0,23	-5,26	0,27	0,10
s	0,04	2,28	0,02	1,16	0	0
VK in %	15,7		8,88		1,29	0
Min	0,24	-9,22	0,21	-7,13	0,26	0,10
Max	0,35	-3,33	0,26	-3,94	0,27	0,10
Positive Kontrollprobe (4 µg PEN/kg)						
XQ	0,72	10,23	0,74	7,48	0,86	7,93
s	0,08	0,73	0,06	0,99	0,01	0,34
VK in %	10,57	7,12	7,64	13,23	0,89	4,30
Min	0,66	9,48	0,66	5,87	0,84	7,50
Max	0,83	11,15	0,81	8,40	0,87	8,23

Beziehungen zwischen visueller und instrumenteller Auswertung bei „incurred“ Proben

Die Proben aus den Behandlungsversuchen wurden nach den Ergebnissen der visuellen Auswertung gruppiert und Mittelwerte sowie Streuungen der Ergebnisse der instrumentellen Messungen in diesen Gruppen berechnet (s. Tab. 2). Die Probenzahl in den Zwischenstufen 2 und 3 ist gering; daher sind die Ergebnisse in diesen Gruppen nur mit Vorbehalt zu interpretieren. Erwartungsgemäß gibt es in den Zwischenstufen 2 und 3 bei instrumenteller Auswertung Überlappungen, während in den visuellen Auswertestufen „negativ“ und „positiv“ die Ergebnisse der Farbmessung immer die erwarteten Resultate erbrachten. Die Überprüfung, ob die vorgeschlagenen Grenzwerte auch für die Untersuchung von Milchproben auf anderen Entnahmeebenen, z.B. Tanksammelwagenmilch, geeignet sind, stehen noch aus.

Tab. 2: Ergebnisse instrumenteller Messungen innerhalb visueller Auswertestufen – Proben: Einzeltiergemelke behandelte Kühe

	Delvo MCS		BR-AS spezial		Copan CMT	
	Rel.Abs. %	Z-Werte	Rel.Abs. %	Z-Werte	Rel.Abs. %	Cif-Werte
<u>Visuelle Auswertestufe 1 (negativ):</u>						
n	98	98	104	104	103	103
XQ	-6,9	-6,8	-1,4	-4,9	-4,4	0,1
s	12,2	2,0	6,5	2,3	2,7	0
Min	-25,0	-11,5	-15,0	-9,9	-15,0	0,1
Max	15,0	-1,1	15,0	-0,9	5	0,2
% negativ*		100		100		100
<u>Visuelle Auswertestufe 2 (leicht verdächtig)</u>						
n	12	12	8	8	11	11
XQ	20,0	-2,8	25,0	-3,3	14,1	0,8
s	10,0	3,1	13,1	1,1	8,3	1,0
Min	5,0	-6,7	5,0	-5,2	5,0	0,1
Max	45,0	1,0	45,0	-1,9	25,0	2,7
% negativ*		83		100		100
<u>Visuelle Auswertestufe 3 (verdächtig)</u>						
n	5	5	4	4	4	4
XQ	42,0	2,0	55,0	-0,03	42,5	4,2
s	8,4	2,5	11,6	4,4	5,0	0,7
Min	35,0	0,6	45,0	-6,3	35,0	3,2
Max	55,0	5,2	65,0	3,1	45,0	4,7
% negativ*		80		75		50
<u>Visuelle Auswertestufe 4 (positiv)</u>						
n	117	117	116	116	114	114
XQ	94,9	12,3	100,8	7,0	91,7	8,3
s	18,7	2,5	12,6	1,4	10,2	0,7
Min	3,0	3,0	65,0	2,3	65,0	6,8
Max	155	18,2	125	10,8	115	9,7
% positiv*		100		100		100

* Vorgeschlagene Grenzwerte: Z-Wert =0, Cif-Wert =4,5

Nachweisempfindlichkeit für PEN und CPZ bei der Untersuchung dotierter und „incurred“ Proben

In Abb. 1 sind die Dosis-Wirkungskurven für die β -Laktamantibiotika CPZ und PEN auf Delvo MCS und Copan CMT dargestellt. Hieraus ergeben sich bei der Untersuchung dotierter Milchproben für beide Tests Nachweisempfindlichkeiten von $\leq 2 \mu\text{g PEN/kg}$ und $\leq 50 \mu\text{g CPZ/kg}$. Die Nachweisempfindlichkeiten liegen damit unterhalb der nach Verordnung EWG 2377/90 (6) festgelegten Höchstmengen (Maximum Residue Limits, MRLs) von $4 \mu\text{g/kg}$ (PEN) bzw. $50 \mu\text{g/kg}$ (CPZ). Beim Delvo MCS-Test ergeben sich zwischen visueller und Scanner-Auswertung deutliche Unterschiede bei der CPZ-Konzentration von $25 \mu\text{g/kg}$. Bei dieser Konzentration wurden die meisten Ergebnisse visuell als verdächtig (Ablesestufe 3) eingestuft, während die Z-Werte deutlich oberhalb des vorgeschlagenen Grenzwertes von $Z \geq 0$ lagen. D.h., dass die Farbmessung hier empfindlicher ist als die visuelle Ablesung.

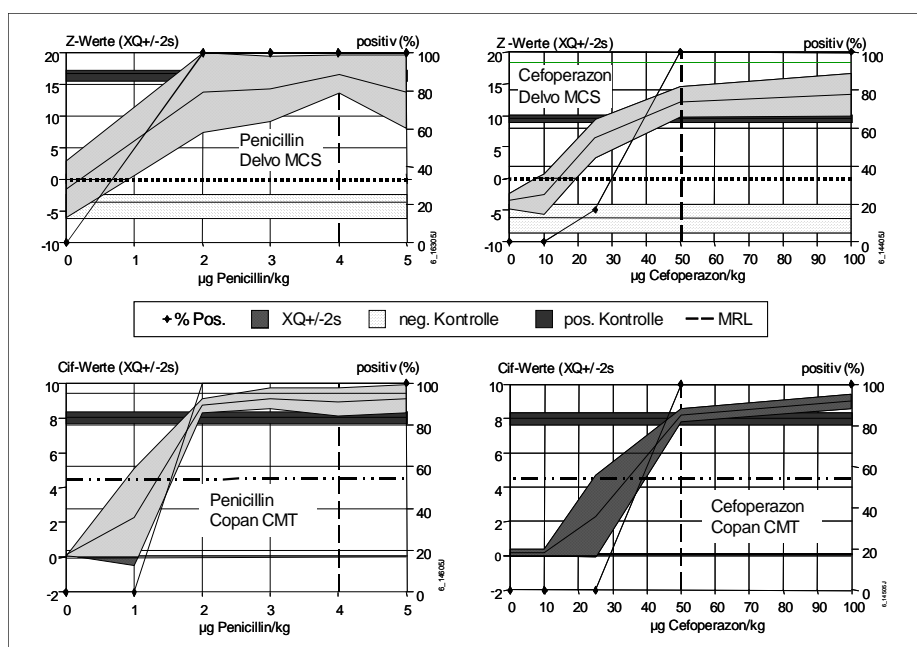


Abb. 1: Dosis-Wirkungskurven von mit Penicillin und Cefoperazon dotierten Milchproben

Abb. 2 zeigt die Beziehungen zwischen den mit Hilfe von HPLC-Analysen ermittelten CPZ-Konzentrationen und den Ergebnissen von *Bacillus*³ *stearothermophilus*-Tests in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen, die mit einem CPZ-haltigen Präparat behandelt worden waren. Es wird deutlich, dass es keinen Fall eines falsch negativen Ergebnisses gab, wenn die CPZ-Konzentration $>40 \mu\text{g/kg}$ und damit im Bereich der mit dotierten Proben festgestellten Nachweisgrenze lag.

³ Nach neueren taxonomischen Studien: *Geobacillus stearothermophilus* (7)

Vereinzel traten sowohl bei den mit CPZ als auch mit PEN behandelten Tieren bei der Farbmessung positive Befunde bei Proben mit Konzentrationen deutlich unter den Nachweisgrenzen auf; visuell wurden diese Proben als leicht verdächtig (Ablesestufe 2) oder verdächtig (Ablesestufe 3) eingestuft:

	PEN	CPZ
Delvo MCS	n=1	n=3
BR-AS spezial	n=0	n=0
Copan CMT	n=2	n=0

Diese „falsch“ positiven Ergebnisse waren bei den angewandten Tests nicht identisch. Aus den Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei der Untersuchung von Einzeltiergemelken „falsch“ positive Ergebnisse auftreten können.

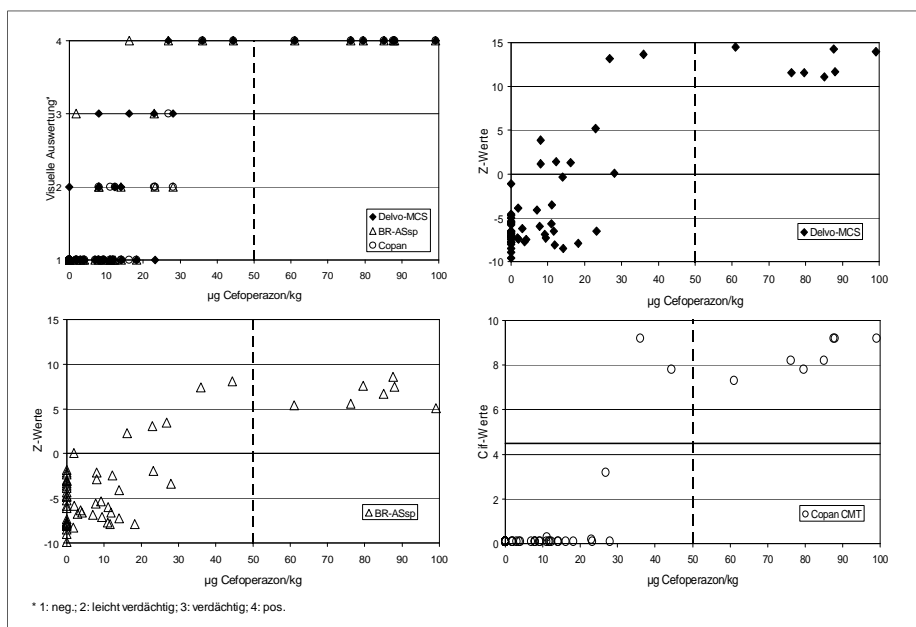


Abb. 2: "Incurred" Milchproben: Beziehungen zwischen CPZ-Gehalt und den Ergebnissen auf *B.stearotherophilus*-Tests

4. Literatur

- (1) Schiffmann, A.P.: Methodische und rechtliche Probleme beim Nachweis von Hemmstoffen in Milch. Diss. med. vet. Hannover, 1992
- (2) Suhren, G., Luitz, M.: Evaluation of microbial inhibitor tests with indicator in microtitre plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft* **50** 467-470 1995
- (3) Adriany, A.: Entwicklung eines modifizierten Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT) zum verbesserten Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Milch. Diss. med. vet., München, 1996

- (4) International Dairy Federation: Milk and milk products – Guidance for the standardized description of microbial inhibitor tests. ISO/13969/IDF 183:2003
- (5) Suhren, G., Walte, H.-G.: Experiences with the application of method combinations for the detection of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers. *Milchwissenschaft* **58** 536-540 2003
- (6) Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official J. European Communities No. L 224/1, 18.8.90
- (7) Nazina, T., Tourova, T., Polaraus, A., Novikova, E., Grgoryan, A., Ivanova, A., Belyaev, S., Ivanov, M.: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus uzensis* sp. Nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus termodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations of *G. stearothermophilus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, part 2 433-446 2001

Danksagung

Dank gebührt allen Mitarbeiter(inne)n des Instituts für Hygiene und Produktsicherheit, die an diesem Projekt mitgearbeitet haben, insbesondere Sabine Holler-Niehus und Heinz Braun für ihre Sorgfalt und ihr Engagement bei den Laboruntersuchungen.

5. Zusammenfassung

Suhren, G., Walte, H.-G.: **Instrumentelle Auswertung von mikrobiologischen Hemmstofftests mit Indikator in Mikrotiterplatten.** *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **57** (2) 73-79 (2005)

06 Veterinärmedizin und Hygiene (mikrobiologische Hemmstofftests, Auswertung)

Hersteller von mikrobiologischen Hemmstofftests bieten Software zur Auswertung durch Farbmessung mit Hilfe von Scannern an. Die Ergebnisse werden als Z- (DSM¹) oder Cif-Werte (Copan²) angegeben; die vorgeschlagenen Grenzwerte sind $Z \geq 0$ bzw. $Cif \geq 4,5$. Erste orientierende Untersuchungen ergaben, dass die Messbereiche der negativen und positiven (4 µg Penicillin/kg) Kontrollproben deutlich getrennt und die Messwerte an verschiedenen Untersuchungstagen konsistent sind. Bei Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen, die mit Penicillin(PEN)- bzw. Cefoperazon(CPZ)-haltigen Präparaten behandelt wurden, wurden die Ergebnisse visueller und instrumenteller Messungen gegenübergestellt. Erwartungsgemäß traten Überlappungen in den visuellen Stufen „verdächtig“ auf, während in den Gruppen „negativ“ bzw. „positiv“ keine abweichenden Ergebnisse gegenüber denen der Farbmessung auftraten. Die Nachweisempfindlichkeiten für PEN und CPZ von Delvo MCS und Copan CMT lagen sowohl bei dotierten als auch bei „incurred“ Proben unterhalb der MRLs; bei diesen Substanzen wurde die Tendenz beobachtet, dass die instrumentelle Auswertung etwas empfindlicher ist als die visuelle. Die Überprüfung, ob die vorgeschlagenen Grenzwerte auch für die Untersuchung von Milchproben anderer Entnahmeebenen, z. B. Tanksammelwagenmilch, geeignet sind, stehen noch aus.

Summary

Suhren, G., Walte, H.-G.: **Instrumental evaluation of microbial inhibitor tests with indicator in microtitre plates.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (2) 73-79 (2005)

06 Veterinary medicine and hygiene (microbiological, inhibitor tests, evaluation)

Manufacturers of microbial inhibitor tests offer software for the evaluation by colour measurement by means of scanners. The results are indicated either as Z-(DSM¹) or as Cif-values (Copan²); the proposed cut-off levels are $Z \geq 0$ and $Cif \geq 4.5$ respectively. In first orientating trials it became obvious that the measuring ranges of negative and positive (4 µg penicillin/kg) control samples differed distinctly and that the results of various examination days were consistent. The results of instrumental reading of milk samples from cows suffering from mastitis, which were treated by a penicillin (PEN) or cefoperazon (CPZ) containing drug were compared to those of visual evaluation. As expected overlapping was observed in the intermediate steps "suspicious" whereas in the groups "negative" and "positive" no deviating results by colour measurement were observed. The detection limits for PEN and CPZ were below the MRLs of these compounds as well for spiked as also for incurred samples; there was the tendency that the instrumental reading was slightly more sensitive than visual evaluation. Examinations whether the proposed cut-off levels are also suitable for the milk of other sampling levels, e.g. collecting tankers, are running.

Résumé

Suhren, G., Walte, H.-G.: **Evaluation instrumentale des tests inhibiteurs microbiologiques avec un indicateur dans des plaques microtitres.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (2) 73-79 (2005)

06 Médecine vétérinaire et hygiène (test inhibiteur microbiologique, évaluation)

Les fabricants de tests inhibiteurs microbiologiques offrent des logiciels pour évaluer par colorimétrie en se servant de scanners. Les résultats sont indiqués comme des valeurs Z-(DSM¹) ou des valeurs Cif (Copan²); Les valeurs limites proposées sont $Z \geq 0$, voire $Cif \geq 4,5$. Les premières analyses d'orientation ont révélé que les domaines de mesures des échantillons de contrôle négatifs et positifs (4 µg pénicilline/kg) sont clairement séparées et que les valeurs mesurées de différents jours d'analyse sont consistantes. Pour des échantillons prélevés de lait de vaches souffrant de mastite, et qui avaient été traitées avec des préparations contenant de la pénicilline (PEN), voire du cefoperazone (CPZ), les résultats mesurés par instrument ont été comparés à ceux obtenus par mesurage visuel. Comme prévu, il y avait des chevauchements dans les classements visuels „suspect“ tandis que dans les groupes „négatif“ voire „positif“, il n'y avait pas eu de résultats divergents par rapport à ceux obtenus par colorimétrie. Les sensibilités de détection pour PEN et CPZ de Delvo MCS et Copan CMT étaient en-dessous des limites maximales de résidus (MRLs), aussi bien pour les échantillons dotés et les échantillons „incurred“; pour ces substances, on a observé la tendance que l'évaluation instrumentale est un peu plus sensible que l'évaluation visuelle. Les analyses pour savoir, si les valeurs limites proposées sont également appropriées pour l'analyse d'échantillons de lait, p.ex. de lait en vrac, doivent encore être réalisées.