

Fünfte Verordnung
zur Änderung der Milch-Güteverordnung ^{*)}

Vom 27. Dezember 1993

Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten verordnet

- auf Grund des § 10 Abs. 1 des Milch- und Fettgesetzes in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 7842-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, der gemäß Artikel 50 der Verordnung vom 26. Februar 1993 (BGBl. I S. 278) geändert worden ist, im Einvernehmen mit dem Bundesministerium für Gesundheit und

- auf Grund des § 20 Abs. 1 Nr. 1 und 2, Abs. 4 und 5 des Milch- und Fettgesetzes im Einvernehmen mit dem Bundesministerium für Wirtschaft nach Bekanntgabe an den Deutschen Bundestag:

Artikel 1

Die Milch-Güteverordnung vom 9. Juli 1980 (BGBl. I S. 878, 1081), zuletzt geändert durch die Verordnung vom 16. April 1992 (BGBl. I S. 950), wird wie folgt geändert:

1. § 2 wird wie folgt geändert:

a) In Absatz 1 Satz 1 werden die Worte »nach Anlage 1« durch die Worte »nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes, Gliederungsnummer L 01.00-9,« ersetzt.

b) In Absatz 2 Satz 1 werden die Worte »nach Anlage 2« durch die Worte »nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes, Gliederungsnummer L 01.00-10,« ersetzt.

c) Absatz 3 wird wie folgt geändert:

aa) In Satz 1 werden die Worte »nach Anlage 3« durch die Worte »nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes, Gliederungsnummer L 01.00-5,« ersetzt.

bb) In Satz 2 werden die Worte »nach Anlage 5« durch die Worte »nach der Anlage« ersetzt.

d) In Absatz 4 werden die Worte »nach Anlage 6« durch die Worte »nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes, Gliederungsnummer L 01.01-1,« ersetzt.

e) Absatz 4a wird wie folgt gefaßt:

»(4a) Zur Feststellung des Gefrierpunktes ist monatlich mindestens eine Untersuchung nach den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes, Gliederungsnummer L 01.00-29, durchzuführen. Besteht auf Grund der Untersuchungsergebnisse der Verdacht auf Wasserzusatz, kann die zuständige Behörde oder die von ihr beauftragte Stelle im Erzeugerbetrieb eine Vollprobe ziehen, die aus den vollständig überwachten Abend- und Morgengemelken besteht, zwischen denen ein zeitlicher Abstand von mindestens 11 und höchstens 13 Stunden liegt.«

f) Absatz 5 Satz 4 wird aufgehoben.

g) Absatz 8 wird wie folgt gefaßt:

»(8) Die Untersuchungsstelle, Molkerei, Milchsammelstelle oder Rahmstation hat, wenn sie in der Anlieferungsmilch Hemmstoffe oder einen Keimgehalt von mehr als 100 000 Keimen je cm³ oder einen Gehalt an somatischen Zellen von mehr als 400 000 je cm³ feststellt, dies dem Milcherzeuger unverzüglich mitzuteilen. Übersteigt in der Anlieferungsmilch der Keimgehalt im geometrischen Mittel über die letzten zwei Monate den Wert von 100 000 Keimen je cm³ oder der Gehalt an

^{*)} Diese Verordnung dient der Umsetzung der Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis (ABl. EG Nr. L 268 S. 1) in deutsches Recht.

somatischen Zellen im geometrischen Mittel über die letzten drei Monate den Wert von 400 000 je cm^3 , ist dies der zuständigen Behörde oder der von ihr beauftragten Stelle unverzüglich zu melden.«

2. § 3 wird wie folgt geändert:

a) In Absatz 1 Satz 2 wird die Tabelle wie folgt gefaßt:

»Mittlerer Keimzahlwert pro cm^3 (Geometrischer Mittelwert)	Klasse
bis 100 000	1
über 100 000	2«.

b) Absatz 3 wird wie folgt gefaßt:

»(3) Die Molkereien, Milchsammelstellen und Rahmstationen können bei Vorliegen folgender Bedingungen einen Zuschlag für eine Klasse S bezahlen:

1. der Keimgehalt der Milch darf im geometrischen Mittel über die letzten zwei Monate den Wert von 50 000 Keimen je cm^3 nicht überschreiten;

2. der Gehalt an somatischen Zellen darf im geometrischen Mittel über die letzten drei Monate den Wert von 300 000 je cm^3 nicht überschreiten;

3. Hemmstoffe dürfen nicht nachgewiesen sein;

4. es darf kein Verdacht auf Wasserzusatz bestehen.

Das Bezahlen eines Zuschlages ist der nach Landesrecht zuständigen Stelle mitzuteilen.«

3. § 4 Abs. 3 wird wie folgt gefaßt:

»(3) Der nach Absatz 2 errechnete Preis gilt für gekühlte Anlieferungsmilch der Klasse 1. Dieser Preis ist im Abrechnungsmonat zu kürzen

1. bei Einstufung in Klasse 2 um mindestens 4 Pf/kg,

2. bei Nachweis von Hemmstoffen je positives Untersuchungsergebnis dieses Monats um 10 Pf/kg und

3. bei Überschreitung des Zellgehaltswertes von 400 000 je cm^3 im geometrischen Mittel über die letzten drei Monate und im Abrechnungsmonat, wobei bei mehreren monatlichen Untersuchungen ebenfalls das geometrische Mittel zu bilden ist, um mindestens 2 Pf/kg.

Werden in zwei Untersuchungen nach dem Monat der Einstufung in eine Klasse Ergebnisse erreicht, die einer qualitativ höheren Klasse entsprechen, so können die Abzüge der höheren Klasse angewendet werden.«

4. In § 6 Nr. 1 werden nach dem Wort »Probenahmegeräte« die Worte »und der Häufigkeit der Proben« eingefügt.

5. Folgender § 6a wird eingefügt:

»§ 6a

Bezugsquelle von Untersuchungsverfahren

Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes, auf die in dieser Verordnung verwiesen wird, werden vom

Bundesgesundheitsamt, Thielallee 88 - 92, 14195 Berlin, veröffentlicht und erscheinen im Beuth Verlag GmbH, Berlin und Köln.«

6. In § 8 werden die Absätze 2 bis 4 wie folgt gefaßt:

»(2) Abweichend von § 3 Abs. 1 Satz 2 ist bis zum 31. Dezember 1997 folgende Bewertung zugrunde zu legen:

(3) Abweichend von § 3 Abs. 3 Satz 1 gilt für die Klasse S bis zum 31. Dezember 1997 ein Keimgehalt von 75 000 pro cm³ und ein Zellgehalt von 350 000 pro cm³ als Grenzwert.

(4) Abweichend von § 4 Abs. 3 Satz 2 ist der Auszahlungspreis im Abrechnungsmonat bis zum 31. Dezember 1997 wie folgt zu kürzen:

1. bei Einstufung in Klasse 2 um 2 Pf/kg, bei Einstufung in Klasse 3 um 4 Pf/kg,

2. bei Nachweis von Hemmstoffen je positives Untersuchungsergebnis dieses Monats um 10 Pf/kg und

3. bei Überschreitung des Zellgehaltes von 400 000 pro cm³ im geometrischen Mittel über die letzten drei Monate und im Abrechnungsmonat, wobei bei mehreren monatlichen Untersuchungen ebenfalls das geometrische Mittel zu bilden ist, um 2 Pf/kg.

Für Molkereien, Milchsammelstellen und Rahmstationen, die ihren Sitz nicht in den Ländern Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen und Berlin haben, gelten die in Satz 1 Nr. 1 und 3 genannten Abzugsbeträge als Mindestbeträge.«

7. Die Anlagen 1, 2, 3, 6 und 7 werden aufgehoben.

8. Die bisherige Anlage 5 wird die einzige Anlage und durch die Anlage zu dieser Verordnung ersetzt.

Artikel 2

Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten kann den Wortlaut der Milch-Güteverordnung in der vom Inkrafttreten dieser Verordnung an geltenden Fassung im Bundesgesetzblatt bekanntmachen.

Artikel 3

Diese Verordnung tritt am 1. Januar 1994 in Kraft.

Der Bundesrat hat zugestimmt.

Bonn, den 27. Dezember 1993

Der Bundesminister
für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
In Vertretung des Staatssekretärs
Dr. Josef Scherer

Anlage (zu Artikel 1 Nr. 8)

Anlage

(zu § 2 Abs. 3 Satz 2)

Feststellung von Stoffen mit antibiotischer Wirkung (Hemmstoffe) in Milch

1. Begriff

Die Probe enthält Hemmstoffe, wenn sie nach dem hier festgelegten Verfahren eine klare Hemmzone hervorruft, deren Durchmesser mindestens derjenigen der gleichzeitig angesetzten Kontrolle mit 0,004 æg (= 0,0067 I.E.1)) Natrium-Benzyl-Penicillin/ml entspricht. Sofern die entsprechende mit Penicillinase versetzte Probe keine oder eine deutlich kleinere Hemmzone hervorruft, enthält sie Penicillin oder Penicillin mit anderen Hemmstoffen. Einige halbsynthetische Penicilline, wie Natriumcloxacillin, werden unter den gegebenen Bedingungen nicht durch Penicillinase inaktiviert und daher nicht als Penicillin erkannt.

2. Kurzbeschreibung

Auf die Oberfläche eines mit einer Kultur von *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* beimpften Agar-Nährbodens wird ein mit der zu untersuchenden Probe getränktes Blättchen gelegt. Beim Bebrüten vermehren sich die Mikroorganismen und bewirken eine Trübung des Agar-Nährbodens. Sind in der Probe Substanzen vorhanden, die das Wachstum der Keime verhindern, so bildet sich um das Blättchen eine klare Zone (Hemmzone). Der Durchmesser der Hemmzone hängt unter anderem von Konzentration und Art des Hemmstoffes in der Probe ab. Eine Hemmzone spricht dann für das Vorhandensein von Penicillin, wenn sich um das Blättchen, das mit der entsprechenden mit Penicillinase versetzten Probe getränkt wurde, keine oder eine deutlich kleinere Hemmzone zeigt.

3. Nährböden, Chemikalien und Testorganismus

Chemikalien und Nährbodenbestandteile müssen für bakteriologische Zwecke geeignet sein. Trockennährböden müssen nach den Anweisungen des Herstellers zubereitet und verwendet werden. Das verwendete Wasser muß entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und mindestens von entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Hemmstoffe gegen Mikroorganismen enthalten.

3.1 Nährboden

3.1.1 Nährboden für Stammkultur (Schrägar) und zum Anzüchten der Gebrauchskultur (Kulturmedium)

Nährbodenbestandteile

2 g Hefeextrakt

5 g Fleischpepton, tryptisch verdaut

1 g Fleischextrakt

5 g Natriumchlorid

10 bis 15 g Agar, je nach Gelieeigenschaften

zu 1000 ml Wasser

Herstellung:

Die einzelnen Bestandteile werden durch Erhitzen und Schütteln vollständig in Wasser gelöst. Der Nährboden wird in Mengen zu 10 ml in Röhrchen (Schrägagar) bzw. in Mengen zu 100 ml in Flaschen abgefüllt und 15 min bei 121 °C $\pm$ 1 °C sterilisiert. Der pH-Wert wird nach dem Sterilisieren auf 7,4 $\pm$ 0,1 eingestellt, bezogen auf eine Temperatur von 45 °C.

Anmerkung:

Es können auch andere Nährböden verwendet werden, die sich bei Kontrolluntersuchungen als für diese Zwecke geeignet erwiesen haben.

1) Gemeint sind die Internationalen Einheiten (I.E.) der durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) standardisierten Wertbestimmungen für die Wirkung von Pharmaka und anderen biologisch aktiven Substanzen.

3.1.2 Nährboden zum Nachweis von Hemmstoffen

Hinweis:

Patentrechtliche Vorschriften über die Verwendung antifolatthaltiger Nährböden sind zu beachten.
Nährbodenbestandteile

2,5 g Hefeextrakt

5 g Caseinpepton, tryptisch verdaut

1 g Glucose

10 ml Trimethoprim-Lösung

10 bis 15 g Agar, je nach Gelieereigenschaft
zu 1000 ml Wasser

Herstellung:

Die festen Bestandteile werden durch Erhitzen und Schütteln vollständig in Wasser gelöst, anschließend wird die Trimethoprim-Lösung nach Abschnitt 3.1.3 hinzugegeben. Der Nährboden wird 15 min bei 121 °C $\pm$ 1 °C sterilisiert. Der pH-Wert ist so einzustellen, daß er nach dem Sterilisieren bei 8,0 $\pm$ 0,1 liegt, gemessen bei einer Temperatur von 45 °C.

3.1.3 Trimethoprim-Lösung

Zusammensetzung

5 mg Trimethoprim

5 ml Ethanol, w = 96 %2)
zu 1000 ml Wasser

Herstellung:

Trimethoprim wird in Ethanol gelöst, anschließend wird die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 0 °C bis 6 °C mindestens 3 Monate haltbar.

Anmerkung:

Es können auch andere Wirkstoffe verwendet werden, die sich bei Kontrolluntersuchungen als wirksam erwiesen haben.

3.2 Penicillin-Standardlösung

3.2.1 In einer verschließbaren, sterilen Flasche wird aus Natrium-Benzyl-Penicillin und sterilem, destilliertem Wasser eine Penicillin-Standardlösung mit einer Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ (= 100 I.E./ml) hergestellt.

3.2.2 Aus 1,25 ml der Penicillin-Standardlösung nach Nummer 3.2.1 wird durch Auffüllen mit sterilem, destilliertem Wasser auf 1 000 ml eine verdünnte Penicillin-Standardlösung mit einer Konzentration von 0,075 $\mu\text{g/ml}$ (= 0,125 I.E./ml) hergestellt.

3.2.3 Aus 4 ml der verdünnten Penicillin-Standardlösung nach Nummer 3.2.2 und 71 ml hemmstofffreiem Substrat nach Nummer 3.4 wird eine Lösung mit einer Penicillin-Konzentration von 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (= 0,0067 I.E./ml) hergestellt.

3.2.4 Die in den Nummern 3.2.1 bis 3.2.3 erwähnten Lösungen dürfen nur am Tag der Herstellung verwendet und sollen bei 5 °C aufbewahrt werden.

3.3 Penicillinase-Lösung

3.3.1 Es wird soviel Penicillinase in sterilem, destilliertem Wasser gelöst, daß sich eine Konzentration von 1000 U/ml ergibt³⁾⁴⁾. Diese Lösung, die vorzugsweise in Portionen abgefüllt werden sollte, darf höchstens 4 Wochen bei etwa 5 °C aufbewahrt werden.

Anmerkung:

Für Penicillinase gibt es keine einheitlichen internationalen Festlegungen. Die Grundlage dieses Verfahrens ist, daß 10 U Penicillinase 0,6 μg (= 1 I.E.) Penicillin inaktivieren. Bei Penicillinase mit unbekannter Aktivität ist es erforderlich festzustellen, ob diese Voraussetzung gegeben ist. Anderenfalls muß die Konzentration der Penicillinase-Lösung entsprechend verändert werden.

3.3.2 Für die Penicillinase-Kontrolle werden von der nach Nummer 5.1 vorbereiteten Probe 10 ml in eine geeignete sterile Weithalsflasche überführt. Anschließend werden 0,4 ml der Penicillinase-Lösung nach Nummer 3.3.1 hinzugefügt und gründlich vermischt.

2) w = Massenanteil.

3) 1 U ist die Enzymaktivität, die bei einer Temperatur von 25 °C unter optimalen Bedingungen eine Substratmenge von 1 μmol je min umsetzt. Siehe dazu auch DIN 58937, Teil 5, Ausgabe Januar 1975, Nummer 6.6.

4) Eine 30fache höhere Penicillinase-Konzentration ermöglicht auch eine starke Inaktivierung von halbsynthetischen Penicillinen, wie Natriumcloxacillin.

Anmerkung:

Anstelle der Penicillinase-Lösung können auch im Handel erhältliche, mit Penicillinase beschickte Blättchen verwendet werden, sofern in einer Kontrolluntersuchung festgestellt wurde, daß die Blättchen eine ausreichende Menge Penicillinase enthalten.

3.4 Hemmstofffreies Substrat

Aus Magermilchpulver und sterilem, destilliertem Wasser wird, falls erforderlich, mit Hilfe steriler Glasperlen eine Suspension mit einem Massegehalt von 10 % hergestellt. Das Magermilchpulver muß sich bei vorhergegangenen Untersuchungen nach dieser amtlichen Methode als hemmstofffrei erwiesen haben.

Alternativ kann eine bei Untersuchungen nach dieser Methode als hemmstofffrei befundene frische Sammelmilchprobe, die in Flaschen abgefüllt, 1 h auf 100 °C erhitzt und danach für höchstens 1 Woche bei 5 °C gelagert wurde, verwendet werden.

3.5 Testorganismus

Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis*, Stamm C 953 (DSM 150; ATTC 10149)

3.5.1 Aufbewahrung des Teststammes

Der Teststamm wird auf dem Nährboden für die Stammkultur nach Nummer 3.1.1 aufbewahrt. Dieser Nährboden wird mit einer Öse der Testkultur beimpft und 48 h bei 63 °C bebrütet. Nach Verschuß kann diese Kultur mehrere Monate bei etwa 5 °C aufbewahrt werden. Längere Aufbewahrung ist durch Lyophilisieren oder durch Lagern in flüssigem Stickstoff möglich.

3.5.2 Anzüchten der Gebrauchskultur

3.5.2.1 Je 20 ml des Nährbodens zum Anzüchten der Gebrauchskultur nach Nummer 3.1.1 werden unter aseptischen Bedingungen in sterile Petrischalen nach Nummer 4.10 übergeführt.

3.5.2.2 Mit einer sterilen Pipette werden 5 ml steriles, destilliertes Wasser in ein Schrägagar-Röhrchen mit Stammkultur nach Nummer 3.5.1 verbracht und die Keime mit Hilfe einer sterilen Öse abgeschwemmt. Diese Keimsuspension muß innerhalb von 36 h verwendet und bei 5 °C aufbewahrt werden.

3.5.2.3 Mit einer sterilen Pipette werden 0,5 ml der Keimsuspension nach Nummer 3.5.2.2 auf eine Petrischale mit Nährboden zum Anzüchten der Gebrauchskultur nach Nummer 3.5.2.1 übertragen und gleichmäßig auf der Nährbodenoberfläche ausgespatelt. Der Nährboden wird 16 h bis 18 h bei 63 °C bebrütet.

Bei Verwendung einer Stammkultur oder einer mehr als 36 h alten Keimsuspension sollte die Subkultivierung mindestens zweimal durchgeführt werden, wobei nicht mehr als 36 h dazwischenliegen sollten.

3.5.2.4 Mit einer sterilen Pipette werden 10 ml steriles, destilliertes Wasser auf die bebrütete Petrischale nach Nummer 3.5.2.3 verbracht und das Keimwachstum mit Hilfe eines Glasstabes abgeschwemmt. Die gewonnene Keimsuspension wird in eine Flasche, die 250 ml steriles, destilliertes Wasser enthält, übergeführt. Die Flasche wird verschlossen und gründlich geschüttelt. Kulturen, die nicht sofort weiterverwendet werden, müssen im Kühlschrank bei Temperaturen von 5 °C aufbewahrt werden.

Anmerkung:

Die Keimsuspension nach Nummer 3.5.2.4 sollte eine derartige Aktivität aufweisen, daß die Penicillin-Kontrollösung nach Nummer 3.2.3 im Testsystem eine klare Hemmzone mit einem Durchmesser von mindestens 2 mm hervorruft. Dies ist erfahrungsgemäß der Fall, wenn die Keimsuspension nach einer Bebrütung von 16 h bis 18 h bei 63 °C auf Plate Count Agar eine Keimzahl von etwa 10^6 je ml aufweist. Die Keimsuspension sollte gleichmäßig getrübt sein.

3.5.3 Herstellen des Testsystems

3.5.3.1 Zu mindestens 50 Volumenteilen des auf etwa 60 °C abgekühlten Nährbodens zum Nachweis von Hemmstoffen nach Nummer 3.1.2 wird 1 Volumenteil der Keimsuspension nach Nummer 3.5.2.4 hinzugefügt und in einer Flasche sorgfältig gemischt.

3.5.3.2 In sterile auf etwa 60 °C erwärmte Petrischalen wird das Testmedium nach Nummer 3.5.3.1 in einer Schichtdicke von 0,6 mm bis 0,8 mm gegossen. Um eine Schichtdicke von 0,8 mm zu erhalten, sind 15 ml Testmedium erforderlich.

3.5.3.3 Zur Verfestigung des Agars werden die Petrischalen ohne Deckel auf eine kalte, nivellierte Fläche gestellt. Nach Erstarren des Nährbodens werden die Petrischalen geschlossen und umgedreht, um die Kondensation auf der Oberfläche des Agars gering zu halten.

3.5.3.4 Die so hergestellten Testplatten werden vorzugsweise am Tage der Herstellung verwendet. Sie können bis zu 2 Wochen aufbewahrt werden, wenn sie sofort nach der Herstellung in einem verschlossenen Kunststoffbeutel bei etwa 5 °C aufbewahrt werden

4. Geräte und Hilfsmittel

Alle Glasgeräte müssen vor der Verwendung sorgfältig gereinigt und sterilisiert werden. Kunststoffgeräte müssen steril sein.

4.1 Dampf-Sterilisator (Autoklav), einstellbar auf 121 °C $\pm$ 1 °C, z.B. Dampf-Sterilisator nach DIN 58 946, Teil 2

4.2 Dampftopf, sofern Dampf-Sterilisator nicht als Dampftopf verwendet werden kann

4.3 Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf mindestens 180 °C

4.4 Brutschrank, einstellbar auf eine Temperatur von 63 °C $\pm$ 1 °C, z.B. Brutschrank nach DIN 58 945, Teil 1

4.5 pH-Meßgerät mit Vorrichtung zur Temperaturkompensation und pH-Meßkette

4.6 Wasserbad, einstellbar auf eine Temperatur von etwa 80 °C

4.7 Blättchen, Durchmesser 12 bis 13 mm, aus Filterpapier mit gleichbleibenden Eigenschaften. Die Saugfähigkeit der einzelnen Blättchen muß gleich sein (etwa 100 mg/Stück). Um sicherzustellen, daß die Blättchen keine Hemmstoffe abgeben, muß von jeder Charge eine Prüfung mit sterilem Wasser durchgeführt werden.

Die Blättchen sollen aus reiner Zellulose (= Zellulosegehalt $w > 98 \%$) hergestellt sein. Der Aschegehalt soll unter $w = 0,06\%$ liegen, der Kupfergehalt unter 1 mg/kg, der Eisengehalt unter 1 mg/kg. Geeignete Blättchen sind 0,88 dick, die flächenbezogene Masse beträgt etwa 350 g/m².

4.8 Flaschen, Nennvolumen 250 ml

4.9 Kulturröhrchen, ausgestattet mit Stopfen oder anderem Verschuß

4.10 Petrischalen, Durchmesser etwa 140 mm, z.B. nach DIN 12 339

4.11 Platindraht-Öse

4.12 Pipetten

4.13 Meßkolben, 50 ml und 1 l

4.14 Pinzetten

5. Durchführung

5.1 Vorbereitung der Probe

Flüssige Milchproben sollen sobald wie möglich, spätestens jedoch innerhalb von 24 h, untersucht werden. Die Proben dürfen für diese Zeit bei höchstens 5 °C aufbewahrt werden. Wenn die Proben nicht innerhalb dieser Zeit untersucht werden können, müssen sie bei Temperaturen zwischen -30 °C und -15 °C gelagert werden, um die Inaktivierung von Hemmstoffen so gering wie möglich zu halten. Derartig gelagerte Proben werden im Wasserbad bei etwa 45 °C aufgetaut und gründlich vermischt.

5.2 Hemmstoffnachweis

5.2.1 Ein Blättchen nach Nummer 4.7 wird mit Hilfe einer sauberen, trockenen Pinzette in die Probe getaucht. Milchüberschuß wird nach Abstreifen des Blättchens an der Probenflasche entfernt. Das Blättchen wird auf die Oberfläche des Agars nach Nummer 4.4.3.3 gelegt und leicht mit der Pinzette angeedrückt.

5.2.2 Die in Nummer 5.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden mit einem anderen Blättchen in gleicher Weise durchgeführt.

5.2.3 Die in Nummer 5.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden fünfmal mit der verdünnten Penicillin-Standardlösung nach Nummer 3.2.3 (0,004 µg/ml = 0,0067 I.E./ml) in gleicher Weise durchgeführt.

5.2.4 Die in Nummer 5.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden zweimal mit der Penicillinase-Kontrolle nach Nummer 3.3.2 in gleicher Weise durchgeführt.

Anmerkung:

Alternativ können auch jeweils 100 µl der Probe, Penicillin-Kontrolle bzw. Penicillinase-Kontrolle auf die einzelnen Blättchen (Nummern 5.2.1 bis einschließlich 5.2.4) aufpipettiert werden.

5.2.5 Alle 9 Blättchen werden in zufälliger Reihenfolge auf dem Agar verteilt. Die einzelnen Blättchen müssen mindestens 20 mm voneinander entfernt bzw. mindestens 10 mm vom Petrischalenrand platziert werden. Die Lage der Blättchen ist zu protokollieren. Die Platten werden umgedreht und 2,5 h bis 5 h bei 63 °C bebrütet.

5.2.6 Nach der Bebrütung werden die Platten vor einer geeigneten Lichtquelle auf Hemmzonen um die Blättchen untersucht.

5.2.7 Die durchschnittlichen Durchmesser der Hemmzonen um Proben, Penicillin-Kontrollen und Penicillinase-Kontrollen werden bestimmt.

6. Auswertung

6.1 Die Durchmesser der Hemmzonen und die Penicillin-Kontrollen nach Nummer 5.2.3 sollten mindestens 2 mm und höchstens 4 mm betragen.

6.2 Proben mit einem gleichgroßen oder größeren Hemmzonendurchmesser als die Penicillin-Kontrollen enthalten Hemmstoffe.

6.3 Wenn sich um die Blättchen mit den Penicillinase-Kontrollen nach Nummer 5.2.4 keine Hemmzonen, jedoch um die Blättchen mit der Probe nach Nummer 5.2.1 und Nummer 5.2.2 Hemmzonen mit einem gleichgroßen oder größeren Durchmesser als bei den Penicillin-Kontrollen bilden, so entspricht die Konzentration der in der Probe enthaltenen Hemmstoffe einer Natrium-Benzyl-Penicillin-Konzentration von mindestens 0,004 µg/ml (= 0,0067 I.E./ml).

6.4 Wenn der Durchmesser der Hemmzone der Penicillinase-Kontrolle gleich dem der Probe ist, so enthält diese Hemmstoffe, die mit der in diesem Verfahren festgelegten Penicillinase-Konzentration nicht inaktiviert und daher nicht identifiziert werden können.

6.5 Wenn der Durchmesser der Hemmzone der Penicillinase-Kontrolle kleiner ist als der der Probe, so enthält diese Penicillin zusammen mit anderen Hemmstoffen oder halbsynthetische Penicilline, die mit der in diesem Verfahren festgelegten Penicillinase-Konzentration nicht inaktiviert und daher nicht identifiziert werden können.

7. Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind mindestens anzugeben:

- Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe,
- Art und Datum der Probenahme,
- Eingangs- und Untersuchungsdatum,
- Untersuchungsergebnisse (siehe Nummer 6).