ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 59507— 2021

МОЛОКО И МОЛОЧНОЕ СЫРЬЕ

Определение наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ иммунологическими методами

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2021

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным автономным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 470 «Молоко и продукты переработки молока»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 мая 2021 г. № 401-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2021

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Отбор проб 3
5 Условия проведения измерений 3
6 Иммунофлуоресцентный метод определения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохимического биоанализатора 3
7 Определение наличия остаточного содержания антибиотиков с применением конкурентного иммуноферментного метода 8
8 Определение наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохроматографического метода 15
9 Требования, обеспечивающие безопасность 26
Приложение А (справочное) Примеры оборудования и тест-систем для проведения иимму-нофлуоресцентного метода определения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохимического биоанализатора 27
Приложение Б (справочное) Комплектация тест-наборов для определения наличия остаточного содержания антибиотиков с применением конкурентного иммуноферментного метода 28
Приложение В (справочное) Примеры оборудования и тест-наборов для определения остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохроматографического метода 29
Библиография 30

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И МОЛОЧНОЕ СЫРЬЕ

Определение наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ иммунологическими методами

Milk and milk raw material. Determination of residual content of antibiotics and drugs by immunological methods

Дата введения — 2021—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое молоко, молочное сырье* (далее — продукт) и устанавливает:

- иммунофлуоресцентный метод определения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохимического биоанализатора;
- определение наличия остаточного содержания антибиотиков с применением конкурентного иммуноферментного метода в диапазоне измерений массовой концентрации антибиотиков 2,0—100,0 мкг/дм^3;
- иммунохроматографический метод определения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ.

Методы, предусмотренные настоящим стандартом, не являются контрольными. В качестве контрольного метода применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

* В настоящем стандарте к молочному сырью относят: пастеризованное молоко, восстановленное молоко, обезжиренное молоко, молочную сыворотку.

Издание официальное

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13928 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25794.1 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования

ГОСТ 26809.1 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 32892 Молоко и молочная продукция. Метод измерения активной кислотности

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р ИСО 707 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по [1] и [2], а также следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 **иммунологические методы:** Лабораторные методы, основанные на специфическом взаимодействии антигенов и антител.

3.1.1 **иммунофлуоресцентный метод:** Иммунологический метод анализа, основанный на использовании в иммунологической реакции антител, меченных флуоресцентной меткой.

3.1.2 **иммуноферментный метод:** Иммунохимический метод определения низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция «антиген-антитело». Для выявления образовавшегося комплекса в качестве метки для регистрации сигнала применяют специфический для каждой реакции фермент или ферментзависимое вещество.

3.1.3 **иммунохроматографический метод:** Иммунохимический метод анализа, основанный на принципе тонкослойной хроматографии и включающий реакцию между антигеном и соответствующим ему антителом в биологических материалах. Проводится с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет.

3.2 **тест-набор (тест-система):** Набор (комплект) специально подобранных реагентов (реактивов) и составных частей, предназначенный для определения одного или нескольких конкретных лекарственных веществ или групп лекарственных веществ.

4 Отбор проб

Отбор и подготовку проб проводят по ГОСТ Р ИСО 707, ГОСТ 13928, ГОСТ 26809.1.

Если измерение не может быть проведено сразу после отбора проб продукта, то срок хранения проб продукта в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более 36 ч.

Титруемая кислотность анализируемого сырого молока не должна превышать 21,0 °Т.

5 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории необходимо соблюдать следующие условия:
температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 30 °С;
относительная влажность воздуха . . . . . (50 ± 30) %;
атмосферное давление . . . . . (96 ± 10) кПа.

6 Иммунофлуоресцентный метод определения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохимического биоанализатора

Иммунофлуоресцентный метод распространяется на сырое молоко и устанавливает одновременное определение наличия остаточного содержания следующих антибиотиков и/или лекарственных веществ с применением иммунохимического биоанализатора:

- аминогликозиды;
- бета-лактамы-пенициллины;
- бета-лактамы-цефалоспорины;
- линкозамиды;
- макролиды;
- полимиксины;
- производные пиримидина;
- сульфаниламиды,
- тетрациклины;
- фениколы;
- хинолоны.

6.1 Сущность метода

Флуоресцентно-меченные специфические рецепторы и антитела, находящиеся во флаконе с реагентами, аффинно связываются с анализируемым продуктом в пробе. При погружении биополоски в анализируемый продукт он мигрирует вдоль биополоски по принципу тонкослойной хроматографии.

При отсутствии анализируемого продукта в пробе конъюгат рецептор/антитело-метка связывается с конъюгатом антиген: белок-носитель, иммобилизованным в тестовой зоне. Несвязавшийся конъюгат антитело-метка попадает в контрольную зону и связывается там с антивидовыми антителами.

Для регистрации флуоресценции метки в тестовой зоне биополоски применяют специальные считывающие устройства (ридеры).

6.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

6.2.1 Биоанализатор иммунохимический с флуоресцентной детекцией, включающий:

6.2.1.1 Тест-набор для проведения иммунохимического анализа, включающий:

6.2.1.1 а) биополоски;

6.2.1.1 б) биореагент иммунохимический, состоящий из лиофилизированной смеси рецепторов/антител.

6.2.1.2 Устройство считывающее, оснащенное программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений.

6.2.1.3 Термостат-инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры точностью ±1 °С.

6.2.1.4 Набор калибровочный, включающий:

6.2.1.4 а) тест-полоску флуоресцентную контрольную;

6.2.1.4 б) тест-полоску калибровочную.

6.2.1.5 Пробы для положительного контроля, состоящие из лиофилизированной смеси антибиотиков.

6.2.2 Термометр жидкостной (не ртутный) диапазоном измерения температуры от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

6.2.3 Часы по ГОСТ 27752 2-го класса точности.

6.2.4 Баня водяная термостатируемая, обеспечивающая поддержание температуры с точностью ±2 °С.

6.2.5 Дозаторы пипеточные (пипет-дозаторы) переменного объема дозирования в диапазоне 0,2—1,0 $см^3$, 1,0—5,0 $см^3$ с наконечниками.

6.2.6 Виалы из темного стекла с крышкой вместимостью 2 $см^3$.

Допускается применение других средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также допускается применение реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

Примеры оборудования и тест-систем для проведения иммунофлуоресцентного метода представлены в приложении А.

6.3 Подготовка к проведению измерений

6.3.1 Приготовление восстановленного раствора пробы продукта для положительного контроля

Во флакон с пробой продукта для положительного контроля (6.2.1.5) добавляют 2 $см^3$ сырого молока, не содержащего антибиотики и/или лекарственные вещества, и закрывают пробкой. Содержимое флакона аккуратно перемешивают, не допуская образования пены.

Срок хранения восстановленного раствора пробы продукта при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 24 ч.

6.3.2 Подготовка биоанализатора

6.3.2.1 Подготовка термостата-инкубатора

Подготовку термостата-инкубатора проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

Термостат-инкубатор прогревают до постоянной температуры (35 ± 1) °С.

6.3.2.2 Подготовка считывающего устройства (6.2.1.2).

Подготовку считывающего устройства проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

6.3.2.2 а) Проверка считывающего устройства

Проверку считывающего устройства проводят с применением флуоресцентной контрольной тест-полоски по 6.2.1 4 а).

Флуоресцентную контрольную тест-полоску по 6.2.1.4 а) помещают в выдвижной приемник считывающего устройства и проводят контрольное измерение в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

Если считывающее устройство работает правильно, на мониторе появляется значение OK.

При появлении на мониторе значения NOT OK необходимо убедиться в правильном положении и целостности флуоресцентной контрольной тест-полоски и повторить контрольное измерение.

При повторном появлении значения NOT OK необходимо провести калибровку считывающего устройства по 6.3.2.2 б).

Контрольное измерение проводят периодически, не реже одного раза в неделю. При более интенсивном использовании считывающего устройства контрольное измерение проводят через каждые 1000 измерений, а также после проведения калибровки и/или очистки оптического окна.

6.3.2.2 б) Калибровка считывающего устройства

Калибровку считывающего устройства проводят с применением калибровочной тест-полоски по 6.2.1.4 б).

Флуоресцентную калибровочную тест-полоску по 6.2.1.4 б) помещают в выдвижной приемник считывающего устройства и проводят калибровку в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

Калибровку считывающего устройства с применением флуоресцентной калибровочной тест-полоски по 6.2.1.4 б) проводят при частом появлении недействительных результатов измерений (INVALID), при повторном появлении значения NOT OK в результате проведения проверки считывающего устройства по 6.3.2.2 а), а также после очистки оптического окна считывающего устройства.

6.3.2.2 в) Дельта-калибровка считывающего устройства

Чистую пустую (без тест-полоски) выдвижную каретку устанавливают (задвигают) в считывающее устройство. Необходимо убедиться, что каретка находится в правильном положении внутри устройства. Только после этого проводят дельта-калибровку согласно инструкции, прилагаемой к прибору.

Дельта-калибровку необходимо проводить при частом появлении недействительных результатов (INVALID) и/или результатов контрольных проверок с отклонением от нормы (NOT OK), а также после очистки оптического окна считывающего устройства.

6.3.3 Подготовка проб

Пробу продукта перемешивают, переворачивая не менее трех раз, не допуская нагревания. Температура продукта должна составлять (6 ± 2) °С.

6.3.4 Подготовка тест-набора к проведению измерений

6.3.4.1 Тест-набор (6.2.1.1) перед применением достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин, избегая воздействия влаги и света.

6.3.4.2 На всех этапах проведения измерений необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

6.4 Проведение измерений

Пробу продукта анализируют в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (пункт 3.14).

6.4.1 В каждый из флаконов, содержащих биореагент, состоящий из смеси рецепторов/антител по 6.2.1.1 б), добавляют по 0,250 $см^3$ пробы продукта, подготовленной по 6.3.3.

6.4.2 Анализируемую пробу продукта, подготовленную по 6.4.1, смешивают с биореагентами, осторожно вращая флакон на рабочей поверхности в течение 10 с. Не допускается переворачивать или встряхивать флакон.

6.4.3 Флакон с пробой продукта по 6.4.2 помещают в термостат-инкубатор (6.2.1.3), подготовленный по 6.3.2.1, и выдерживают при температуре (35 ± 1) °С в течение 3 мин, активируя таймер термостата-инкубатора.

6.4.4 Не вынимая флакон с анализируемой пробой продукта по 6.4.3 из термостата-инкубатора, в него помещают биополоску по 6.2.1.1 а) и продолжают инкубирование при температуре (35 ± 1) °С в течение 10 мин (после чего биополоска подготовлена к считыванию результата).

6.4.5 По истечении 10 мин биополоску вынимают из флакона с биореагентом и помещают в выдвижной приемник считывающего устройства (ридера), подготовленного по 6.3.2.2.

Считывание результатов проводят не позднее чем через 3 мин после окончания инкубации.

6.4.6 Проведение повторного измерения

Повторное измерение проводят в случае, если анализируемая проба продукта определена как положительная.

6.4.6.1 Анализируемую пробу продукта измеряют параллельно вместе с раствором пробы продукта для положительного контроля, приготовленным по 6.3.1, предварительно изменив конфигурацию анализа и выбрав только те каналы, которые показали положительный результат.

6.4.6.2 Во флакон, содержащий биореагент, состоящий из смеси рецепторов/антител по 6.2.1.1 б), добавляют 0,250 $см^3$ пробы продукта, подготовленной по 6.3.3.

6.4.6.3 Затем измерения проводят по 6.4.2—6.4.5.

6.5 Обработка результатов измерений

6.5.1 Для обработки и регистрации результатов измерений анализируемой пробы продукта применяют считывающее устройство (6.2.1.2), оснащенное программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений и подготовленное к работе по 6.3.2.2.

Визуальная интерпретация биополоски невозможна, т. к. окрашивание отсутствует.

6.5.2 Обработку результатов проводят в течение 3 мин после окончания проведения второго инкубирования, при этом не допускается снимать с биополоски фильтрующую прокладку для анализируемой пробы продукта.

6.5.3 Результаты измерений отражаются на дисплее считывающего устройства и сохраняются в памяти прибора.

Если анализируемая проба продукта определена как отрицательная, то на экране отобразится результат теста «Отрицательный». Это означает отсутствие наличия остаточного содержания антибиотиков и/или лекарственных веществ в анализируемой пробе продукта или их массовая концентрация менее предела обнаружения.

Если анализируемая проба продукта определена как положительная, то на экране отобразится результат теста «Положительный». Это означает, что массовая концентрация определяемых антибиотиков и/или лекарственных веществ в анализируемой пробе продукта более или равна пределу обнаружения. В этом случае проводят повторное измерение по 6.4.6.

6.5.4 Если результаты измерений, полученные при повторном анализе, проведенном по 6.4.6, вновь положительные, то анализируемая проба продукта считается положительной.

6.6 Метрологические характеристики

Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ в сыром молоке представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ в сыром молоке

Наименование определяемых веществ	Определяемое лекарственное вещество	Предел обнаружения мкг/кг
Аминогликозиды	Апрамицин	30—50
	Гентамицин (сумма С1, С1а, С2, С2а)	1—5
	Дигидрострептомицин	50—100
	Канамицин А	0,5—1
	Неомицин В	1000
	Паромомицин	50—100
	Сисомицин	2—5
	Стрептомицин	50—100
Бета-лактамы Пенициллины	Амоксициллин	3
	Ампициллин	4
	Аспоксициллин	1—2
	Бензилпенициллин (Пенициллин G)	2
	Диклоксациллин	8
	Клоксациллин	12
	Нафциллин	350
	Оксациллин	16
	Пиперациллин	0,5—1
	Сульбактам	100—1000
	Тазобактам	1000
	Тикарциллин	10—15
	Феноксиметилпенициллин (Пенициллин V)	4
Бета-лактамы Цефалоспорины	Дезацетилцефапирин	16
	Десфуроилцефтиофур	60
	Цефадроксил	4

Продолжение таблицы 1

Наименование определяемых веществ	Определяемое лекарственное вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Бета-лактамы Цефалоспорины	Цефазолин	9
	Цефалексин	4
	Цефалониум	3
	Цефапирин	4
	Цефацетрил	9
	Цефкином	14
	Цефоперазон	3
	Цефтизоксим	200
	Цефтиофур	8
	Цефтриаксон	6
	Цефуроксим	90
Линкозамиды	Клиндамицин	1—3
	Линкомицин	2—5
	Пирлимицин	15—50
Макролиды	Десмикозин (тилозин В)	1—4
	Неоспирамицин	90—160
	Рокситромицин	700
	Спирамицин	80—150
	Тилмикозин	1—4
	Тилозин А	1—4
	Эритромицин	30
Полимиксины	Колистин	30
Производные пиримидина	Баквилоприм	25—60
	Триметоприм	1—2
Сульфаниламиды	Сульфагуанидин	7
	Сульфадиазин	3
	Сульфадиметоксин	5
	Сульфазалазин	115
	Сульфамеразин	1
	Сульфаметазин	1
	Сульфаметер	2
	Сульфаметизол	150
	Сульфаметоксазол	100
	Сульфаметоксипиридазин	1
	Сульфамоксол	1

Окончание таблицы 1

Наименование определяемых веществ	Определяемое лекарственное вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Сульфаниламиды	Сульфамонометоксин	2
	Сульфапиридин	1
	Сульфатиазол	3
	Сульфахиноксалин	4
	Сульфахлоропиридазин	8
Тетрациклины	Доксициклин	1—4
	Окситетрациклин (ОТС)	5—8
	Тетрациклин (ТС)	7—10
	Хлортетрациклин (СТС)	2—5
Фениколы	Левомицетин	0,15—0,25
	Левомицетина сукцинат	0,15—0,25
Хинолоны	Данофлоксацин	14
	Дифлоксацин	16
	Марбофлоксацин	14
	Налидиксовая кислота	150
	Норфлоксацин	20
	Оксолоновая кислота	125
	Офлоксацин	10—15
Хинолоны	Пефлоксацин	10—15
	Сарафлоксацин	16
	Флумеквин	25
	Ципрофлоксацин	16
	Энрофлоксацин	14

7 Определение наличия остаточного содержания антибиотиков с применением конкурентного иммуноферментного метода

Остаточное содержание антибиотиков тетрациклина, пенициллина, стрептомицина и хлорамфеникола в сыром молоке и молочном сырье определяют конкурентным иммуноферментным методом с применением тест-наборов.

7.1 Сущность метода

Метод основан на конкуренции антибиотиков, адсорбированных на дискретных участках лунок микропланшета, и антибиотиков, присутствующих в градуировочных растворах или растворах проб продукта, за активные центры связывания антител. Свободные и иммобилизованные на планшете молекулы антибиотика конкурируют за связывание с антителами. В ходе иммуноспецифической реакции образуются комплексы «антитела — антибиотики», которые при добавлении ферментного субстрата окрашиваются в голубой цвет. При внесении стоп-раствора ферментная реакция прекращается, цвет комплекса меняется на желтый, интенсивность которого определяют фотометрически при длине волны 450 нм.

Массовая концентрация определяемого антибиотика обратно пропорциональна интенсивности окрашивания. Массовую концентрацию антибиотика в анализируемом продукте определяют на основании измеренного отношения оптической плотности раствора анализируемой пробы продукта к оптической плотности нулевого градуировочного раствора и установленной градуировочной зависимости с учетом фактора разведения.

7.2 Определение наличия остаточного содержания тетрациклина

Диапазон измерения массовой концентрации тетрациклина в анализируемом продукте 2,0—100,0 мкг/дм^3.

7.2.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

7.2.1.1 Тест-набор для определения наличия остаточного содержания тетрациклина (см. приложение Б, пункт Б.1), включающий:

7.2.1.1 а) микропланшет с лунками, покрытыми антителами к тетрациклину;

7.2.1.1 б) концентраты градуировочных растворов тетрациклина для приготовления растворов массовой концентрации 0; 0,04; 0,1; 0,4; 1,0 и 4,0 мкг/дм^3;

7.2.1.1 в) конъюгат (тетрациклин-пероксидаза) лиофилизированный;

7.2.1.1 г) раствор субстрата;

7.2.1.1 д) стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;

7.2.1.1 е) раствор буфера для разведения и экстракции концентрированный;

7.2.1.1 ж) раствор для промывания концентрированный;

7.2.1.2 Фотометр (спектрофотометр), позволяющий проводить измерение оптической плотности растворов заполненного микропланшета (двухволновой режим) в диапазоне длин волн от 400 до 750 нм, в оптическом диапазоне от 0,001 до 4,000 ед. оптической плотности с точностью не более 2 %.

7.2.1.3 Термометр жидкостной стеклянный диапазоном измерения температуры от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

7.2.1.4 Часы по ГОСТ 27752, 2-го класса точности

7.2.1.5 Вортекс лабораторный, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин.

7.2.1.6 Термостат лабораторный, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С.

7.2.1.7 Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 3000 *g*.

7.2.1.8 Дозатор пипеточный (пипет-дозатор) одноканальный переменного объема дозирования в диапазоне 10—100 мм^3, 100—1000 мм^3, 1—10 см^3 с наконечниками.

7.2.1.9 Дозатор пипеточный (пипет-дозатор) многоканальный переменного объема дозирования в диапазоне 30—300 мм^3 с наконечниками.

7.2.1.10 Пипетки 1-2-1, 1-2-5 по ГОСТ 29169.

7.2.1.11 Пипетки 1-2-2-5(10) по ГОСТ 29227.

7.2.1.12 Цилиндры 1(3)-25(50, 100)-2 по ГОСТ 1770.

7.2.1.13 Колбы конические Кн-1(2)-100 по ГОСТ 25336.

7.2.1.14 Пробирки П-2-15-14/23 ХС по ГОСТ 1770 или пластиковые.

7.2.1.15 Пробирки микроцентрифужные стерильные типа Эппендорф из полипропилена вместимостью 2,5 см^3.

7.2.1.16 Стаканы В(Н)-1-150 по ГОСТ 25336.

7.2.1.17 Бутыль пластиковая вместимостью 250 см^3 с крышкой.

7.2.1.18 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

7.2.1.19 Штатив для пробирок.

7.2.1.20 Кювета (ванночка) реагентная для многоканального дозатора.

7.2.1.21 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Комплектация тест-наборов для определения остаточных количеств антибиотиков с применением конкурентного иммуноферментного метода представлена в приложении Б.

Допускается применение других средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

7.2.2 Подготовка к проведению измерений

7.2.2.1 Приготовление реактивов и реагентов

Перед началом измерений тест-набор достают из холодильника и выдерживают при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 30 мин.

При работе не допускается попадание прямых солнечных лучей на реагенты тест-набора.

Перед использованием жидкие реагенты перемешивают, осторожно вращая или переворачивая флаконы, не допуская образования пены. Отбирают только необходимое количество реагента. Не допускается возвращать реагент в оригинальный флакон.

7.2.2.1 а) Приготовление раствора конъюгата тетрациклин-пероксидаза

Во флакон с конъюгатом тетрациклин-пероксидаза по 7.2.1.1 в) добавляют 2,5 $см^3$ дистиллированной воды по ГОСТ 6709 и перемешивают, энергично встряхивая на вортексе в течение 5 мин.

Срок хранения раствора коньюгата при температуре (минус 20 ± 2) °С — не более 1 мес. Не допускается повторное замораживание раствора конъюгата.

7.2.2.1 б) Приготовление рабочего раствора буфера для разведения и экстракции

В пластиковую бутыль вместимостью 250 $см^3$ вносят 25 $см^3$ раствора буфера для разведения и экстракции по 7.2.1.1 е), добавляют 225 $см^3$ дистиллированной воды и тщательно перемешивают, встряхивая бутыль.

Срок хранения рабочего раствора буфера при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

Примечание — При образовании в процессе хранения в буфере кристаллов, его выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 15 мин и затем тщательно перемешивают, встряхивая до полного растворения кристаллов.

7.2.2.1 в) Приготовление рабочего раствора для промывания

В пластиковую бутыль вместимостью 250 $см^3$ вносят 25 $см^3$ концентрированного раствора для промывания по 7.2.1.1 ж), добавляют 225 $см^3$ дистиллированной воды и тщательно перемешивают, встряхивая бутыль.

Срок хранения рабочего раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

Примечание — При образовании в процессе хранения в растворе для промывания кристаллов, его выдерживают при температуре (37±1) °С в течение 15 мин и тщательно перемешивают, встряхивая до полного растворения кристаллов.

7.2.2.1 г) Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Готовят градуировочные растворы массовой концентрации тетрациклина 0,00; 0,04; 0,10; 0,40; 1,00 и 4,00 $мкг/дм^3$.

В микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 2,5 $см^3$ помещают по 20 $мм^3$ концентратов градуировочных растворов тетрациклина по 7.2.1.1 б), добавляют по 1980 $мм^3$ рабочего раствора буфера для разведения и экстракции, приготовленного по 7.2.2.1 б), и аккуратно перемешивают.

Срок хранения готовых градуировочных растворов тетрациклина при температуре (4 ± 2) °С — не более 12 ч.

7.2.2.2 Подготовка анализируемой пробы продукта

7.2.2.2 а) Пробу продукта выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин, аккуратно перемешивают. Затем в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 50 $см^3$ пробы продукта и тщательно перемешивают на вортексе.

7.2.2.2 б) В пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают 5 $см^3$ подготовленной пробы продукта и инкубируют при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 мин. По истечении 30 мин пробу продукта центрифугируют с центробежным ускорением 3000 *g* в течение 10 мин.

Верхнюю фракцию, содержащую жир, удаляют. Из нижней фракции отбирают 1,0 $см^3$ и переносят в новую чистую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. Добавляют 9,0 $см^3$ рабочего раствора буфера для разведения и экстракции, приготовленного по 7.2.2.1 б). Полученную анализируемую пробу продукта встряхивают на вортексе в течение 5 мин.

7.2.3 Проведение измерений

Пробу продукта анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (пункт 3.14).

7.2.3.1 В лунки микропланшета вносят по 100 $мм^3$ каждого градуировочного раствора тетрациклина, приготовленного по 7.2.2.1 г), в порядке возрастания массовой концентрации тетрациклина: 0; 0,04; 0,10; 0,40; 1,00 и 4,00 $мкг/дм^3$. В лунки для растворов проб вносят по 100 $мм^3$ растворов каждой из параллельной анализируемой пробы продукта, подготовленных по 7.2.2.2.

7.2.3.2 В каждую лунку микропланшета вносят по 50 $мм^3$ раствора конъюгата, приготовленного по 7.2.2.1 а). Допускается использование многоканального дозатора.

Планшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 60 мин.

7.2.3.3 По окончании инкубирования лунки микропланшета промывают, добавляя в каждую лунку по 300 мм^3 рабочего раствора для промывания, приготовленного по 7.2.2.1 в), и выливая его резким переворачиванием и встряхиванием планшета. Процедуру повторяют 3 раза. Рекомендуется использовать многоканальный дозатор.

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого фильтровальной бумагой по ГОСТ 12026.

7.2.3.4 Затем в каждую лунку вносят по 100 мм^3 раствора субстрата по 7.2.1.1 г).

Планшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 20 мин. Раствор окрашивается в голубой цвет.

7.2.3.5 Для остановки реакции окрашивания в каждую лунку вносят по 100 мм^3 стоп-раствора по 7.2.1.1 д), при этом цвет растворов в лунках меняется с голубого на желтый. Окраска раствора должна быть стабильной в течение 30 мин.

7.2.3.6 В течение 30 мин после внесения стоп-раствора измеряют оптическую плотность растворов в каждой лунке при длине волны 450 нм.

7.2.4 Обработка результатов измерений

7.2.4.1 Обработку результатов измерений проводят по оптической плотности растворов аналитов, полученной на спектрофотометре при длине волны 450 нм посредством программного обеспечения.

За положительный результат принимаются показатели оптической плотности растворов аналитов, находящихся в диапазоне градуировочных растворов тетрациклина.

7.3 Определение наличия остаточного содержания пенициллина

7.3.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

7.3.1.1 Тест-набор для определения наличия остаточного содержания пенициллина (см. приложение Б, пункт Б.2), включающий:

7.3.1.1 а) микропланшет с лунками, покрытыми антителами к пенициллину;

7.3.1.1 б) растворы градуировочные пенициллина массовой концентрации 0; 4,0; 10,0; 40,0; 100,0 и 400,0 мкг/дм^3;

7.3.1.1 в) раствор антител к пенициллину;

7.3.1.1 г) раствор конъюгата;

7.3.1.1 д) раствор субстрата;

7.3.1.1 е) стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;

7.3.1.1 ж) раствор для разведения концентрированный;

7.3.1.1 з) раствор для промывания концентрированный.

Допускается применение других средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

7.3.2 Подготовка к проведению измерений

7.3.2.1 Приготовление реактивов и реагентов

Перед началом измерений тест-набор достают из холодильника и выдерживают при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 30 мин.

При проведении измерений не допускается попадание прямых солнечных лучей на реагенты тест-набора.

Перед измерением жидкие реагенты перемешивают, осторожно вращая или переворачивая флаконы, не допуская образования пены. Отбирают только необходимое количество реагента. Не допускается возвращать реагент в оригинальный флакон.

7.3.2.1 а) Приготовление рабочего раствора для разведения

В пластиковую бутылку вместимостью 250 см^3 вносят 25 см^3 концентрированного раствора для разведения по 7.3.1.1 ж), добавляют 225 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают, встряхивая бутыль.

Срок хранения рабочего раствора при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

Примечание — При образовании в растворе в процессе хранения кристаллов, его выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 15 мин и затем тщательно перемешивают, встряхивая до полного растворения кристаллов.

7.3.2.1 б) Приготовление рабочего раствора для промывания

В пластиковую бутылку вместимостью 250 $см^3$ вносят 25 $см^3$ концентрированного раствора для промывания по 7.3.1.1 з), добавляют 225 $см^3$ дистиллированной воды и тщательно перемешивают, встряхивая бутыль.

Срок хранения рабочего раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

Примечание — При образовании в растворе в процессе хранения кристаллов, его выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 15 мин и затем тщательно перемешивают, встряхивая до полного растворения кристаллов.

7.3.2.2 Подготовка анализируемой пробы продукта

Продукт выдерживают при температуре от 20 °С до 2 °С в течение 30 мин, аккуратно перемешивают. В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 50 $см^3$ анализируемого продукта и тщательно перемешивают на вортексе.

В пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают 5 $см^3$ подготовленной пробы продукта и инкубируют при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 мин. По истечении 30 мин пробу центрифугируют с центробежным ускорением 3000 *g* в течение 10 мин.

Верхнюю фракцию, содержащую жир, удаляют. Из нижней фракции отбирают 2,0 $см^3$ и переносят в новую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. Добавляют 8,0 $см^3$ рабочего раствора для разведения, приготовленного по 7.3.2.1 а). Полученную анализируемую пробу продукта встряхивают на вортексе в течение 5 мин.

7.3.3 Проведение измерений

Пробу продукта анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (пункт 3.14).

7.3.3.1 В лунки микропланшета вносят по 100 $мм^3$ каждого градуировочного раствора пенициллина по 7.3.1.1 б) в порядке возрастания массовой концентрации пенициллина: 0; 4,0; 10,0; 40,0; 100,0 и 400,0 $мкг/дм^3$. В лунки для растворов проб вносят по 100 $мм^3$ растворов каждой анализируемой пробы продукта, подготовленной по 7.3.2.2.

7.3.3.2 В каждую лунку микропланшета вносят по 50 $мм^3$ раствора антител к пенициллину [7.3.1.1 в)]. Допускается использование многоканального дозатора.

Микропланшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 60 мин.

7.3.3.3 По окончании инкубирования лунки микропланшета промывают, добавляя в каждую из них по 300 $мм^3$ рабочего раствора для промывания, приготовленного по 7.3.2.1 б), и выливая его резким переворачиванием и встряхиванием микропланшета. Так повторяют 3 раза. Рекомендуется использовать многоканальный дозатор.

После последнего промывания микропланшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого фильтровальной бумагой.

7.3.3.4 Затем в каждую лунку вносят по 100 $мм^3$ раствора конъюгата по 7.3.1.1 г).

Микропланшет инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 60 мин. Раствор окрашивается в голубой цвет.

7.3.3.5 По окончании инкубирования лунки промывают в соответствии с 7.3.3.3.

7.3.3.6 В каждую лунку вносят по 100 $мм^3$ раствора субстрата по 7.3.1.1 д). Микропланшет помещают в темное место и выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 20 мин. Раствор окрашивается в голубой цвет.

Для остановки реакции окрашивания в каждую лунку вносят по 100 $мм^3$ стоп-раствора по 7.3.1.1 е), при этом цвет растворов в лунках меняется с голубого на желтый. Окраска должна быть стабильной в течение 30 мин.

7.3.3.7 В течение 30 мин после внесения стоп-раствора измеряют оптическую плотность растворов в каждой лунке при длине волны 450 нм.

7.3.4 Обработка результатов измерений

7.3.4.1 Обработку результатов измерений проводят по оптической плотности растворов аналитов, полученной на спектрофотометре при длине волны 450 нм посредством программного обеспечения.

За положительный результат принимаются показатели оптической плотности растворов аналитов, находящихся в диапазоне градуировочных растворов пенициллина.

7.4 Определение наличия остаточного содержания стрептомицина

7.4.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

7.4.1.1 Тест-набор для определения наличия остаточного одержания стрептомицина (см. приложение Б, пункт Б.3), включающий:

7.4.1.1 а) микропланшет с лунками, покрытыми антителами к стрептомицину;

7.4.1.1 б) растворы градуировочные стрептомицина массовой концентрации 0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0 и 200,0 мкг/дм^3,

7.4.1.1 в) раствор антител к стрептомицину;

7.4.1.1 г) раствор конъюгата;

7.4.1.1 д) раствор субстрата;

7.4.1.1 е) стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;

7.4.1.1 ж) раствор для разведения;

7.4.1.1 з) раствор для промывания концентрированный.

Допускается применение других средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

7.4.2 Подготовка к проведению измерений

7.4.2.1 Приготовление реактивов и реагентов

7.4.2.1 а) Перед началом измерений тест-набор достают из холодильника и выдерживают при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 30 мин.

При подготовке к измерению не допускается попадание прямых солнечных лучей на реагенты тест-набора.

Жидкие реагенты перед применением перемешивают, осторожно вращая или переворачивая флаконы, не допуская образования пены. Отбирают только необходимое количество реагента. Не допускается возвращать реагент в оригинальный флакон.

7.4.2.1 б) Приготовление рабочего раствора для промывания

В пластиковую бутылку вместимостью 250 см^3 вносят 25 см^3 концентрированного раствора для промывания по 7.4.1.1 з), добавляют 225 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают, встряхивая бутыль.

Срок хранения рабочего раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

Примечание — При образовании в растворе в процессе хранения кристаллов, его выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 15 мин и затем тщательно перемешивают, встряхивая до полного растворения кристаллов.

7.4.2.2 Подготовка анализируемой пробы продукта

Продукт выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин, аккуратно перемешивают. В коническую колбу вместимостью 100 см^3 помещают 50 см^3 пробы продукта и тщательно перемешивают на вортексе.

В пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см^3 помещают 5 см^3 подготовленной пробы продукта и инкубируют при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 мин. По истечении 30 мин пробу продукта центрифугируют с центробежным ускорением 3000 *g* в течение 10 мин.

Верхнюю фракцию, содержащую жир, удаляют. Из нижней фракции отбирают 1,0 см^3 и переносят в новую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см^3. Добавляют 8,0 см^3 рабочего раствора для разведения, приготовленного по 7.4.1.1 ж). Полученную анализируемую пробу продукта встряхивают на вортексе в течение 5 мин.

7.4.3 Проведение измерений

Пробу продукта анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (пункт 3.14).

7.4.3.1 В лунки микропланшета вносят по 100 мм^3 каждого градуировочного раствора стрептомицина [7.4.1.1 б)] в порядке возрастания массовой концентрации стрептомицина: 0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0 и 200,0 мкг/дм^3. В лунки для растворов проб вносят по 100 мм^3 растворов каждой анализируемой пробы продукта, подготовленной по 7.4.2.2.

7.4.3.2 В каждую лунку микропланшета вносят по 50 мм^3 раствора антител к стрептомицину [7.4.1.1 в)]. Допускается использование многоканального дозатора.

Микропланшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин.

7.4.3.3 Затем в каждую лунку вносят по 50 мм^3 раствора конъюгата [7.4.1.1 г)].

Микропланшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 15 мин.

7.4.3.4 По окончании инкубирования лунки планшета промывают, добавляя в каждую из них по 300 мм^3 рабочего раствора для промывания, приготовленного по 7.4.2.1 б), и выливая его резким переворачиванием и встряхиванием планшета. Процедуру повторяют 3 раза. Рекомендуется использовать многоканальный дозатор.

После последнего промывания микропланшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого фильтровальной бумагой по ГОСТ 12026.

7.4.3.5 В каждую лунку вносят по 100 мм^3 раствора субстрата [7.4.1.1 д)]. Микропланшет помещают в темное место и выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 15 мин. Раствор окрашивается в голубой цвет.

Для остановки реакции окрашивания в каждую лунку вносят по 100 мм^3 стоп-раствора [7.4.1.1 е)], при этом цвет растворов в лунках меняется с голубого на желтый. Окраска должна быть стабильной в течение 30 мин.

7.4.3.6 В течение 30 мин после внесения стоп-раствора измеряют оптическую плотность растворов в каждой лунке при длине волны 450 нм.

7.4.4 Обработка результатов измерений

7.4.4.1 Обработку результатов измерений проводят по оптической плотности растворов аналитов, полученной на спектрофотометре при длине волны 450 нм посредством программного обеспечения.

За положительный результат принимаются показатели оптической плотности растворов аналитов, находящихся в диапазоне градуировочных растворов стрептомицина.

7.5 Определение наличия остаточного содержания хлорамфеникола

7.5.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

7.5.1.1 Тест-набор для определения наличия остаточного содержания хлорамфеникола (см. приложение Б, пункт Б.4), включающий:

7.5.1.1 а) микропланшет с лунками, покрытыми антителами к хлорамфениколу;

7.5.1.1 б) градуировочные растворы хлорамфеникола массовой концентрации 0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 и 5,00 мкг/дм^3;

7.5.1.1 в) раствор антител к хлорамфениколу;

7.5.1.1 г) раствор конъюгата;

7.5.1.1 д) раствор субстрата;

7.5.1.1 е) стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;

7.5.1.1 ж) раствор для промывания концентрированный.

Допускается применение других средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

7.5.2 Подготовка к проведению измерений

7.5.2.1 Приготовление реактивов и реагентов

7.5.2.1 а) Перед началом измерений тест-набор достают из холодильника и выдерживают при температуре от 18 °С до 25 °С в течение 30 мин.

При измерении не допускается попадание прямых солнечных лучей на реагенты тест-набора.

Жидкие реагенты перед применением перемешивают, осторожно вращая или переворачивая флаконы, не допуская образования пены. Отбирают только необходимое количество реагента. Не допускается возвращать реагент в оригинальный флакон.

7.5.2.1 б) Приготовление рабочего раствора для промывания

В пластиковую бутылку вместимостью 250 см^3 вносят 25 см^3 концентрированного раствора для промывания [7.5.1.1 ж)], добавляют 225 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают, встряхивая бутыль.

Срок хранения полученного раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

Примечание — При образовании в процессе хранения раствора кристаллов, его выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 15 мин и тщательно перемешивают, встряхивая до полного растворения кристаллов.

7.5.2.2 Подготовка анализируемой пробы продукта

Продукт выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин, аккуратно перемешивают. В коническую колбу вместимостью 100 см^3 помещают 50 см^3 анализируемого продукта и тщательно перемешивают на вортексе.

В пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают 5 $см^3$ подготовленной пробы продукта и инкубируют при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 мин. По истечении 30 мин пробу центрифугируют с центробежным ускорением 3000 *g* в течение 10 мин.

Верхнюю фракцию, содержащую жир, удаляют. Нижнюю фракцию доводят до температуры (20—25) °С и затем анализируют.

7.5.3 Проведение измерений

Пробу продукта анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (пункт 3.14).

7.5.3.1 В лунки микропланшета вносят по 100 $мм^3$ каждого градуировочного раствора хлорамфеникола [7.5.1.1 б)] в порядке возрастания массовой концентрации хлорамфеникола: 0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 и 5,00 $мкг/дм^3$. В лунки для растворов проб носят по 100 $мм^3$ анализируемой пробы продукта, подготовленной по 7.5.2.2.

7.5.3.2 В каждую лунку микропланшета вносят по 50 $мм^3$ раствора антител к хлорамфениколу [7.5.1.1 в)]. Допускается использование многоканального дозатора.

Микропланшет ланшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин.

7.5.3.3 Затем в каждую лунку вносят по 50 $мм^3$ раствора конъюгата [7.5.1.1 г)].

Микропланшет выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин.

7.5.3.4 По окончании инкубирования лунки планшета промывают, добавляя в каждую из них по 300 $мм^3$ рабочего раствора для промывания, приготовленного по 7.5.2.1.2, и выливая его резким переворачиванием и встряхиванием микропланшета. Процедуру повторяют 3 раза. Рекомендуется использовать многоканальный дозатор.

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого фильтровальной бумагой.

7.5.3.5 В каждую лунку вносят по 100 $мм^3$ раствора субстрата [7.5.1.1 д)]. Микропланшет помещают в темное место и выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 15 мин. Раствор окрашивается в голубой цвет.

Для остановки реакции окрашивания в каждую лунку вносят по 100 $мм^3$ стоп-раствора [7.5.1.1 е)], при этом цвет растворов в лунках меняется с голубого на желтый. Окраска должна быть стабильной в течение 10 мин.

7.5.3.6 В течение 10 мин после внесения стоп-раствора измеряют оптическую плотность растворов в каждой лунке при длине волны 450 нм.

7.5.4 Обработка результатов измерений

7.5.4.1 Обработку результатов измерений проводят по оптической плотности растворов аналитов, полученной на спектрофотометре при длине волны 450 нм посредством программного обеспечения.

За положительный результат принимаются показатели оптической плотности растворов аналитов, находящихся в диапазоне градуировочных растворов хлорамфеникола.

8 Определение наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохроматографического метода

Наличие остаточного содержания антибиотиков и/или лекарственных веществ в сыром молоке и молочном сырье определяют иммунохроматическим методом с применением тест-наборов.

8.1 Сущность метода

Метод основан на связывании остаточного содержания антибиотиков и/или лекарственных веществ, находящихся в анализируемой пробе продукта, с антителами, вызывающими окрашиваемую иммунохроматическую реакцию, с последующим определением интенсивности окраски продуктов биохимической реакции визуальным методом или инструментальным с применением считывающего устройства.

8.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

8.2.1 Тест-набор № 1 для определения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, хинолонов, сульфаниламидов и тетрациклиновой группы в молоке и молочном сырье (см. приложение В, пункты В.2—В.9), включающий:

8.2.1.1 тест-полоски;

8.2.1.2 образец контрольный «Положительный контроль» таблетированный.

8.2.2 Тест-набор № 2 для определения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицина в молоке и молочном сырье (см. приложение В, пункт В.4), включающий:

8.2.2.1 тест-полоски;

8.2.2.2 образец контрольный «Положительный контроль» таблетированный.

8.2.3 Тест-набор № 3 для определения наличия остаточного содержания аминогликозидов в молоке и молочном сырье, включающий:

8.2.3.1 тест-полоски;

8.2.3.2 образец контрольный «Положительный контроль» таблетированный.

8.2.4 Тест-набор № 4 для определения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, тетрациклиновой группы, амфеникола и аминогликозидов в молоке и молочном сырье, включающий:

8.2.4.1 тест-полоски;

8.2.4.2 образец контрольный «Положительный контроль» таблетированный.

8.2.5 Тест-набор № 5 для определения наличия остаточного содержания флуниксина в молоке и молочном сырье, включающий:

8.2.5.1 тест-полоски;

8.2.5.2 образец контрольный «Положительный контроль», содержащий флуниксин (500 мкг/кг).

8.2.6 Тест-набор № 6 для определения наличия остаточного содержания амфениколов в молоке и молочном сырье, включающий:

8.2.6.1 тест-полоски;

8.2.6.2 образец контрольный «Положительный контроль» таблетированный, содержащий хлорамфеникол (0,15 мкг/кг).

8.2.7 Тест-набор № 7 для определения остаточного содержания макролидов и гентамицина в молоке и молочном сырье, включающий:

8.2.7.1 тест-полоски;

8.2.7.2 образец контрольный «Положительный контроль» таблетированный.

8.2.8 Термостат-инкубатор или прибор, совмещающий функции инкубатора и считывающего устройства, обеспечивающий поддержание температуры (40 ± 2) °С и (56 ± 2) °С, оснащенный программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений и набором калибровочных тест-полосок для проверки работы считывающего устройства.

8.2.9 Устройство считывающее, оснащенное программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений и набором калибровочных тест-полосок для проверки работы считывающего устройства.

8.2.10 Анализатор потенциометрический диапазоном измерения 1—14 ед. pH погрешностью ±0,02 ед. pH.

8.2.11 Весы по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,1 г.

8.2.12 Термометр жидкостной (не ртутный) диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

8.2.13 Часы по ГОСТ 27752, 2-го класса точности.

8.2.14 Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение (1200 ± 200) *g*.

8.2.15 Дозаторы пипеточные (пипет-дозаторы), обеспечивающие объем дозирования 0,300 $см^3$, 5,0 $см^3$ с наконечниками.

8.2.16 Пипетки 1-2-1, 1-2-5 по ГОСТ 29169.

8.2.17 Виалы с крышкой вместимостью 2 $см^3$.

8.2.18 Стаканы В-1-250 (400) по ГОСТ 25336.

8.2.19 Флаконы с крышками вместимостью 10—20 $см^3$.

8.2.20 Концентрат «Отрицательный контроль» лиофилизированный.

8.2.21 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328 х.ч., или ч.д.а., или стандарт-титр, раствор молярной концентрации 0,1 моль/дм^3.

8.2.22 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

8.3 Подготовка к проведению измерений

8.3.1 Приготовление реактивов и реагентов

8.3.1.1 Приготовление раствора «Положительный контроль»

8.3.1.1 а) Приготовление раствора «Положительный контроль» при использовании тест-наборов № 1, № 2, № 3, № 4, № 6, № 7

Во флакон вместимостью 10 см^3 помещают одну таблетку «Положительного контроля», добавляют 5,0 см^3 продукта, не содержащего антибиотиков и/или лекарственных веществ, и закрывают крышкой. Содержимое флакона тщательно перемешивают и выдерживают при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 мин.

Срок хранения раствора «Положительный контроль» при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 48 ч.

Допускается замораживание раствора «Положительный контроль» в течение шести часов после приготовления. Срок хранения замороженного раствора «Положительный контроль» при температуре (минус 15 ± 2) °С — не более 1 мес.

Замороженный раствор «Положительный контроль» размораживают при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 8 ч и затем тщательно перемешивают встряхиванием. Срок хранения размороженного раствора «Положительный контроль» при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 24 ч.

8.3.1.1 б) Приготовление раствора «Положительный контроль» при использовании тест-набора № 5

Во флакон с раствором «Положительный контроль» добавляют 10.0 см^3 продукта, не содержащего антибиотиков и/или лекарственных веществ, и закрывают крышкой. Содержимое флакона тщательно перемешивают и выдерживают при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 5 мин.

Срок хранения раствора «Положительный контроль» при использовании тест-набора № 5 при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 48 ч.

8.3.1.2 Приготовление раствора «Отрицательный контроль»

Для раствора «Отрицательный контроль» применяют продукт, не содержащий антибиотиков или лекарственных веществ.

Срок хранения раствора «Отрицательный контроль» при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 72 ч.

8.3.1.3 Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации c(NaOH) = = 0,1 моль/дм^3

Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 и проверку его молярной концентрации проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 25794.1.

Срок хранения раствора в бутыли из темного стекла при температуре (20 ± 5) °С — не более 1 мес.

8.3.2 Подготовка термостата-инкубатора или прибора, совмещающего функции инкубатора и считывающего устройства

8.3.2.1 Подготовку проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

Крышка инкубатора должна быть всегда закрыта, за исключением времени внесения на тест-полоску анализируемой пробы продукта.

Температуру инкубатора устанавливают (56 ± 2) °С для тест-наборов № 1, 2, 3, 6 и 7 и (40 ± 2) °С — для тест-наборов № 4 и 5.

8.3.2.2 Проверка термостата-инкубатора или прибора, совмещающего функции инкубатора и считывающего устройства

Проверку оборудования проводят с применением контрольной тест-полоски (8.2.1.1) и раствора «Отрицательный контроль» (8.3.1.2).

Контрольное измерение проводят по 8.4 ежедневно, а также перед проведением повторного измерения анализируемых проб продукта, определенных как положительные.

8.3.3 Подготовка анализируемой пробы продукта

Температура анализируемого продукта должна быть в диапазоне от 0 °С до 1 °С.

8.3.3.1 Молоко сырое, восстановленное, пастеризованное и обезжиренное

Перед проведением измерений пробу продукта аккуратно перемешивают до получения однородной массы, переворачивая контейнер несколько раз, не допуская образования пузырьков воздуха.

Допускается замораживание пробы продукта. Пробу продукта делят на аликвоты объемом 0,5 $см^3$, помещают в виалы с крышкой и хранят при температуре (минус 15 ± 2) °С не более 1 мес.

Замороженные аликвоты размораживают при температуре от 2 °С до 8 °С в течение восьми часов и затем тщательно перемешивают встряхиванием. Размороженные пробы продукта допускается хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч.

Перед измерением размороженные пробы продукта центрифугируют с центробежным ускорением (1200 ± 200) *g* в течение 3 мин. Для анализа используют нижнюю обезжиренную фракцию пробы продукта, которую переносят в чистую пробирку. Размороженные пробы продукта используют не более 24 ч после размораживания.

8.3.3.2 Жидкая молочная сыворотка

8.3.3.2 а) Содержание сухих веществ жидкой сыворотки доводят до значения 6 %—8 %, добавляя дистиллированную воду. Для жидкой сыворотки с содержанием сухих веществ не более 8 % разбавление не требуется.

8.3.3.2 б) Измеряют значение pH жидкой сыворотки согласно ГОСТ 32892, которое должно находиться в пределах 6,8—6,9 ед. pH. При необходимости проводят корректировку значения pH, добавляя раствор гидроокиси натрия молярной концентрации $c(NaOH)$ = 1 моль/$дм^3$, приготовленный по 8.3.1.3.

8.3.3.2 в) Пробу продукта, подготовленную по 8.3.3.2 б), центрифугируют с центробежным ускорением (1200±200) *g* в течение 7 мин.

8.3.3.2 г) Отбирают 5 $см^3$ надосадочной жидкости и растворяют в ней лиофилизированный концентрат «Отрицательный контроль» (8.2.20). Для сокращения времени растворения лиофилизированного концентрата «Отрицательный контроль» смесь нагревают до температуры (45—50) °С.

После полного растворения лиофилизированного концентрата «Отрицательный контроль» анализируемую пробу продукта охлаждают до температуры (4 ± 2) °С.

8.3.3.3 Сухая молочная сыворотка

8.3.3.3 а) В стакан вместимостью 50 $см^3$ помещают (1,0 ± 0,1) г сухой сыворотки, добавляют 9 $см^3$ дистиллированной воды температурой (45—50) °С и аккуратно перемешивают до полного исчезновения комков, избегая образования пены. Допускается перемешивание на магнитной мешалке.

8.3.3.3 б) Измеряют значение pH растворенной сыворотки согласно ГОСТ 32892, которое должно находиться в пределах 6,8—6,9 ед. pH. При необходимости проводят корректировку значения pH, добавляя раствор гидроокиси натрия молярной концентрации $c(NaOH)$ = 1 моль/$дм^3$, приготовленный по 8.3.1.3.

8.3.3.3 в) Пробу продукта, подготовленную по 8.3.3 б), центрифугируют с центробежным ускорением (1200 ± 200) *g* в течение 7 мин.

8.3.3.3 г) Отбирают 5 $см^3$ надосадочной жидкости и растворяют в ней лиофилизированный концентрат «Отрицательный контроль» (8.2.20). Для сокращения времени растворения лиофилизированного концентрата «Отрицательный контроль» смесь нагревают до температуры (45—50) °С.

После полного растворения лиофилизированного концентрата «Отрицательный контроль» анализируемую пробу продукта охлаждают до температуры (4 ± 2) °С.

8.3.4 Подготовка тест-набора к проведению измерений

8.3.4.1 Перед использованием тест-набор достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин, не допуская воздействия солнечного света.

8.3.4.2 На всех этапах проведения измерений необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

8.3.4.3 Цвет индикатора осушителя в контейнере для тест-полосок должен быть синим. Если цвет индикатора изменился на фиолетовый или розовый, то такие тест-полоски для измерений применять не допускается.

8.4 Проведение измерений

Пробу продукта анализируют в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (пункт 3.14).

8.4.1 Измерение проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору тестовых полосок, инкубатору и считывающему устройству.

Крышка инкубатора должна быть всегда закрыта, за исключением времени внесения на тест-полоску анализируемой пробы продукта.

Индикатор температуры в инкубаторе должен показывать температуру 56 °С, что соответствует значению (56,0 ± 2,0) °С, или 40 °С, что соответствует значению (40,0 ± 2,0) °С.

8.4.2 В специальную секцию инкубатора помещают тест-полоску таким образом, чтобы плоская сторона тест-полоски была направлена вверх, а выпуклая сторона — вниз, для плотного прилегания тест-полоски в инкубаторе. Придерживая тест-полоску в инкубаторе, отклеивают с нее защитное покрытие.

В специальную ячейку тест-полоски помещают 0,3 $см^3$ анализируемой пробы продукта, подготовленной по 8.3.3, при этом пипет-дозатор необходимо держать вертикально. Тест-полоску запечатывают, прижимая обратно отклеенное защитное покрытие, и закрывают крышку инкубатора.

8.4.3 Тест-полоски с нанесенной анализируемой пробой продукта инкубируют в течение 6 мин.

8.4.5 По окончании инкубирования тест-полоску извлекают из инкубатора и приступают к визуальной обработке результатов измерений. Затем тест-полоску помещают в считывающее устройство. Считывающее устройство автоматически распознает тест-полоску и выдает результат на экран.

8.4.6 При использовании прибора, совмещающего в себе функции инкубатора и считывающего устройства, время и температура инкубирования выставляются автоматически. Дополнительного подтверждения результата при помощи считывающего устройства не требуется.

8.4.7 Проведение повторного измерения

Повторное измерение проводят, если анализируемая проба продукта определена как положительная.

8.4.7.1 Анализируемую пробу продукта измеряют вместе с раствором «Положительный контроль», приготовленным по 8.3.1.1, и раствором «Отрицательный контроль», приготовленным по 8.3.1.2.

8.4.7.2 Раствор «Положительный контроль» должен иметь положительный результат. Если результат измерения не является положительным, то измерение повторяют.

8.4.7.3 Раствор «Отрицательный контроль» должен иметь отрицательный результат. Если результат измерения не является отрицательным, то измерение повторяют.

8.5 Обработка результатов измерений

8.5.1 Результаты измерений отражаются на дисплее анализатора и сохраняются в памяти прибора.

Если анализируемая проба продукта определена как отрицательная, то программное обеспечение отображает значение «Результат отрицательный». Это означает, что антибиотики и/или лекарственные вещества в анализируемой пробе продукта отсутствуют или их массовая концентрация менее предела обнаружения.

Если анализируемая проба продукта определена как положительная, то программное обеспечение отображает «Результат положительный». Массовая концентрация определяемых антибиотиков и/или лекарственных веществ в анализируемой пробе продукта более или равна пределу обнаружения. В этом случае проводят повторное измерение согласно 8.4.2.

8.5.2 Если результаты измерений, полученные при повторном измерении, проведенном согласно 8.4.2, растворов «Положительный контроль» (8.3.1.1) и «Отрицательный контроль» (8.3.1.2), соответствуют заданным значениям, а результаты, полученные при измерении анализируемой пробы продукта, отображаются как «Результат положительный», то анализируемая проба продукта считается положительной, т. е. массовая концентрация определяемых антибиотиков и/или лекарственных веществ в анализируемом пробе продукта более или равна пределу обнаружения.

8.5.3 Для выявления недействительных результатов анализа проводят визуальный осмотр тест-полоски.

8.5.3.1 В случае, если контрольная линия (на рисунке 1 линия С) отсутствует, размыта, неровная или неравномерно окрашена или если анализируемая проба продукта затемняет контрольную линию (на рисунке 1 линия С) или тестовые линии с антибиотиками и/или лекарственными веществами, результат анализа считают недействительным и проводят повторное измерение анализируемой пробы продукта.

Виды тестовых полосок с результатами визуального анализа, который считается недействительным, представлены на рисунках 1—7.

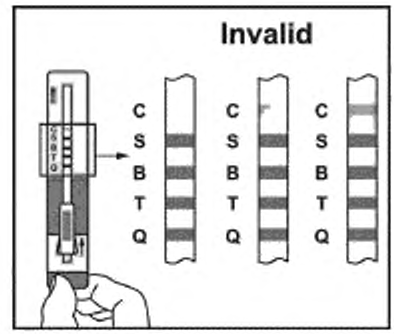

Рисунок 1 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 1

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная), S (сульфаниламиды), B (бета-лактамы), T (тетрациклины), Q (хинолоны).

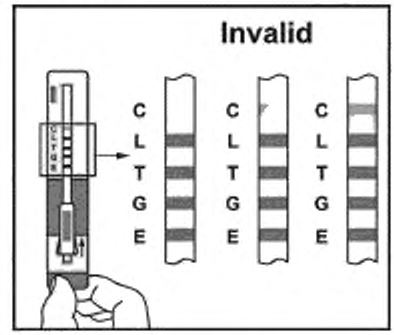

Рисунок 2 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 2

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная), L (линкомицин), T (тилозин), G (гентамицин), E (эритромицин).

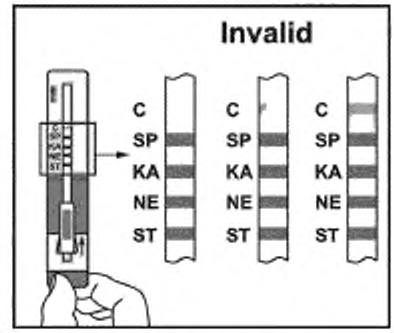

Рисунок 3 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 3

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная), SP (спектиномицин), КА (канамицин), NE (неомицин), ST (стрептомицин).

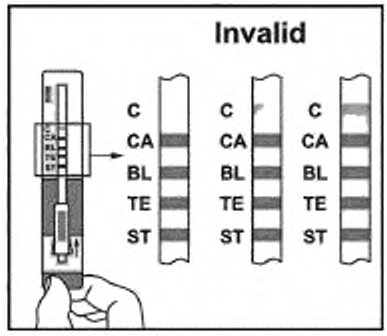

Рисунок 4 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 4

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная),
СА (хлорамфеникол), BL (бета-лактам), ТЕ (тетрациклин) и ST (стрептомицин).

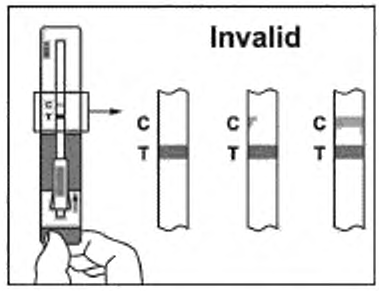

Рисунок 5 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 5

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная), Т (флуниксин).

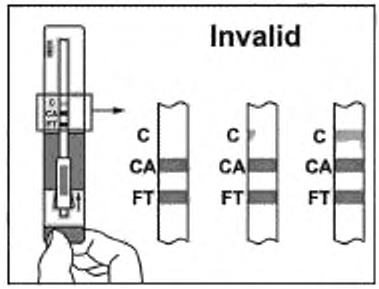

Рисунок 6 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 6

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная), СА (хлорамфеникол), FT (флорфеникол/тиамфеникол).

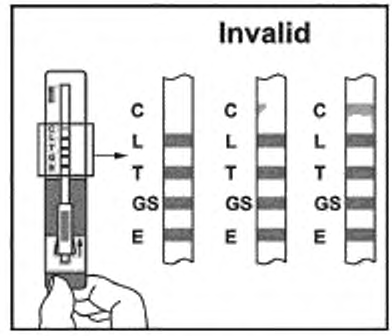

Рисунок 7 — Недействительный результат визуального анализа при использовании тест-набора № 7

Анализ является недействительным, если:
- линия С (контрольная) отсутствует;
- линия С размытая или неровная;
- анализируемая проба продукта заслоняет линии С (контрольная),

L (линкомицин/пирлимицин), Т (тилозин/тильмикозин), GS (гентамицин/спирамицин), Е (эритромицин).

8.6 Метрологические характеристики

8.6.1 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, хинолонов, сульфонамидов и тетрациклиновой группы в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 1 приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, хинолонов, сульфаниламидов и тетрациклиновой группы в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 1

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Бета-лактамная группа	Амоксициллин	2—4
	Ампициллин	2—4
	Диклоксациллин	15—20
	Клоксациллин	15—25
	Оксациллин	15—25
	Пенициллин G	2—4
	Цефалексин	40—80
	Цефалоний	4—8
	Цефазолин	15—25
	Цефацетрил	20—40
	Цефоперазон	1—3
	Цефтиофур и метаболиты	50—70

Окончание таблицы 2

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Бета-лактамная группа	Цефуроксим	15—25
	Цефапирин	6—10
	Цефхином	8—15
Сульфаниламидные препараты	Сульфадиазин	10—20
	Сульфадиметоксин	10—20
	Сульфадимидин (Сульфамазин)	10—20
	Сульфадоксин	80—100
	Сульфаквиноксалин	10—20
	Сульфисоксазол	10—20
	Сульфамеразин	20—40
	Сульфаметизол	10—20
	Сульфаметоксазол	30—50
	Сульфаметоксипиридазин	20—40
	Сульфапиридин	10—20
	Сульфатиазол	10—20
	Сульфахлорпиридазин	10—20
	Сульфацетамид	30—50
	Сульфаэтоксипиридазин	10—20
Хинолоны	Данофлоксацин	15—20
	Левофлоксацин	10—15
	Марбофлоксацин	20—30
	Налидиксовая кислота	10—15
	Норфлоксацин	5—10
	Офлоксацин	10—15
	Пефлоксацин	5—10
	Флумекин	20—40
	Ципрофлоксацин	10—15
	Энрофлоксацин	10—15
Тетрациклиновая группа	Доксициклин	80—100
	Окситетрациклин	40—70
	Тетрациклин	5—20
	Хлортетрациклин	40—70

8.6.2 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицина в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 2 приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицина в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 2

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Макролиды	Линкомицин	25—50
	Пирлимицин	50—100
	Тилмикозин	20—40
	Тилозин	10—25
	Эритромицин	10—30
Аминогликозиды	Гентамицин	100—150

8.6.3 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания аминогликозидов в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 3 приведены в таблице 4.

Таблица 4 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания аминогликозидов в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 3

Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Дигидрострептомицин	75—100
Канамицин	75—100
Неомицин	175—250
Спектиномицин	150—200
Стрептомицин	100—175

8.6.4 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, тетрациклиновой группы, амфеникола и аминогликозидов группы в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 4 приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, тетрациклиновой группы, амфеникола и аминогликозидов группы в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 4

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Бета-лактамная группа	Амоксициллин	3—4
	Ампициллин	3—4
	Диклоксациллин	20—30
	Клоксациллин	20—30
	Пенициллин G	2—3
	Цефазолин	20—40
	Цефалониум	8—12
	Цефапирин	15—25
	Цефацетрил	20—40
	Цефкином	10—20
	Цефоперазон	1—3
	Цефтиофур и метаболиты^	30-40

Окончание таблицы 5

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Тетрациклиновая группа	Окситетрациклин	6—10
	Тетрациклин	6—10
	Хлортетрациклин	6—10
Амфеникол	Хлорамфеникол	0,2—0,3
Аминогликозиды	Дигидро-стрептомицин	125—200
	Стрептомицин	75—100

8.6.5 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания флуниксина в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 5 приведены в таблице 6.

Таблица 6 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания флуниксина в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 5

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Флуниксин	5-Гидроксифлуниксин	40—50

8.6.6 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания амфениколов в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 6 приведены в таблице 7.

Таблица 7 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания амфениколов в сыром молоке и молочном сырье с использованием тест-набора № 6

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Амфениколы	Тиамфеникол	4—6
	Флорфеникол	4—6
	Хлорамфеникол	0,15

8.6.7 Пределы обнаружения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицинов в сыром молоке с использованием тест-набора № 7 приведены в таблице 8.

Таблица 8 — Пределы обнаружения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицина в сыром молоке с использованием тест-набора № 7

Наименование группы определяемых веществ	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/кг
Макролиды	Линкомицин	100—150
	Пирлимицин	50—100
	Спирамицин	150—200
	Тилмикозин	25—40
	Тилозин	10—30
	Эритромицин	10—30
Аминогликозиды	Гентамицин	100—150

9 Требования, обеспечивающие безопасность

9.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

9.2 Требования к оператору

Выполнение измерений проводит специалист, имеющий специальное образование и освоивший метод в соответствии с требованиями настоящего стандарта. Специалисты, принимающие антибактериальные и противовирусные препараты, при проведении измерений должны пользоваться перчатками.

Приложение А
(справочное)

Примеры оборудования и тест-систем для проведения иммунофлуоресцентного метода определения наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохимического биоанализатора

А.1 Биоанализатор иммунохимический с флуоресцентной детекцией, например, типа *EXTENSO* (*Unisensor s.a.*, Бельгия*), включающий:

А.1.1 Тест-набор для проведения измерений, содержащий:

- биополоски;
- биореагент, состоящий из лиофилизированной смеси рецепторов/антител.

А.1.2 Считывающее устройство, оснащенное программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений.

А.1.3 Термостат-инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры с точностью ±1 °С.

А.1.4 Калибровочный набор, включающий:

- тест-полоску флуоресцентную контрольную;
- тест-полоску калибровочную.

А.1.5 Пробы для положительного контроля, состоящие из лиофилизированной смеси антибиотиков.

* Данная информация не является рекламой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Приложение Б
(справочное)

Комплектация тест-наборов для определения наличия остаточного содержания антибиотиков с применением конкурентного иммуноферментного метода

Б.1 Тест-набор* для определения массовой концентрации тетрациклина, включающий:

- микропланшет с лунками, покрытыми антителами к тетрациклину;
- концентраты градуировочных растворов тетрациклина для приготовления градуировочных растворов массовой концентрации 0; 0,04; 0,1; 0,4; 1,0 и 4,0 мкг/дм^3;
- реагент конъюгата концентрированный (тетрациклин-пероксидаза) лиофилизированный;
- субстрат (TMB);
- стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;
- раствор буфера для разведения и экстракции (Tris);
- раствор для промывания (PBS+Tween 20).

Б.2 Тест-набор* для определения массовой концентрации пенициллина, включающий:

- микропланшет с лунками, покрытыми антителами к пенициллину;
- градуировочные растворы пенициллина массовой концентрации 0; 4,0; 10,0; 40,0; 100,0 и 400,0 мкг/дм^3;
- раствор антител к пенициллину;
- раствор конъюгата;
- раствор субстрата (TMB);
- стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;
- раствор для разведения (PBS), концентрированный;
- раствор для промывания (PBS+Tween 20) концентрированный.

Б.3 Тест-набор* для определения массовой концентрации стрептомицина, включающий:

- микропланшет с лунками, покрытыми антителами к стрептомицину;
- градуировочные растворы стрептомицина массовой концентрации 0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0 и 200,0 мкг/см^3;
- раствор антител к стрептомицину;
- раствор конъюгата (стрептомицин-пероксидаза);
- раствор субстрата (TMB);
- стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;
- раствор для разведения (PBS);
- раствор для промывания (PBS+Tween 20) концентрированный.

Б.4 Тест-набор* для определения массовой концентрации остаточного количества хлорамфеникола, включающий:

- микропланшет с лунками, покрытыми антителами к хлорамфениколу;
- градуировочные растворы хлорамфеникола массовой концентрации 0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 и 5,00 мкг/дм^3;
- раствор антител к хлорамфениколу;
- раствор конъюгата (хлорамфеникол-пероксидаза);
- раствор субстрата (TMB);
- стоп-раствор — раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3;
- раствор для промывания (PBS+Tween 20) концентрированный.

Например, тест-наборы типа «Oxiline^{TM} ELISA», Германия.

* Данная информация не является рекламой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Приложение В
(справочное)

Примеры оборудования и тест-наборов для определения остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ с применением иммунохроматографического метода

В.1 Считывающее устройство, оснащенное программным обеспечением для управления и обработки результатов измерений и набором калибровочных тест-полосок для проверки работы считывающего устройства. Например, типа *EZ Reader* (*Charm Sciences, Inc.*, США)*.

В.2 Термостат-инкубатор или прибор, совмещающий функции инкубатора и считывающего устройства. Например, типа *Rosa Incubator или EZ Reader* (*Charm Sciences, Inc.*, США)*.

В.3 Тест-набор № 1 для определения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, хинолонов, сульфаниламидов и тетрациклиновой группы в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm®QUAD1»*.

В.4 Тест-набор № 2 для определения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицина в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm®QUAD2-G»*.

В.5 Тест-набор № 3 для определения наличия остаточного содержания аминогликозидов в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm®QUAD3»*.

В.6 Тест-набор № 4 для определения наличия остаточного содержания антибиотиков бета-лактамной группы, тетрациклиновой группы, амфеникола и аминогликозидов в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm®QUAD RUS»*.

В.7 Тест-набор № 5 для определения наличия остаточного содержания антибиотика флуниксина в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm LF- FLU»*.

В.8 Тест-набор № 6 для определения наличия остаточного содержания амфениколов в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm®Amphenicol»*.

В.9 Тест набор № 7 для определения наличия остаточного содержания макролидов и гентамицина в молоке и молочных продуктах. Например, типа «Charm®QUAD2»*.

* Данная информация не является рекламой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 О безопасности молока и молочной продукции

[2] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 О безопасности пищевой продукции

УДК 637.147.2:543.06:006.354 ОКС 67.100.10

Ключевые слова: сырое молоко, молочное сырье, антибиотики, лекарственные вещества, иммунологические методы, иммунофлуоресцентный метод с применением иммунохимического биоанализатора, иммуноферментный метод, иммунохроматографический метод, тест-наборы

Редактор *З.Н. Киселева*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 20.05.2021. Подписано в печать 08.06.2021. Формат 60×84¼. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,55.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru