МКС 67.100.10

к СТБ ISO/TS 26844-2009 Молоко и молочные продукты. Определение антибактериальных остатков. Метод диффузии в пробирке

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.3.3.3. Второе предложение	Приготовленная контрольная проба молока содержит 150 мкг/л окситетрациклина.	Приготовленная контрольная проба молока содержит 150 мкг/л сульфадиазина.

(ИУ ТНПА № 6-2012)

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO/TS 26844-2009

Молоко и молочные продукты
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСТАТКОВ
Метод диффузии в пробирке

Малако і малочныя прадукты
ВЫЗНАЧЭННЕ АНТЫБАКТЭРЫЯЛЬНЫХ АСТАТКАЎ
Метад дыфузіі ў прабірцы

(ISO/TS 26844:2006, IDT)

Издание официальное

БЗ 7-2009



Госстандарт
Минск

УДК 637.14.075(083.74)(476) МКС 67.100.10 КП 03 IDT

Ключевые слова: молоко, антибактериальные препараты, метод диффузии, тест-культура микроорганизмов

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 29 декабря 2009 г. № 73

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO/TS 26844:2006 Milk and milk products – Determination of antimicrobial residues – Tube diffusion test (Молоко и молочные продукты. Определение антибактериальных остатков. Метод диффузии в пробирке).

Международный стандарт разработан Международной федерацией молочной продукции (IDF) подкомитета SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета ISO/TS 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT).

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2010

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Принцип метода 1
5 Тест-культура микроорганизмов, питательная среда, стандартные растворы и контрольные пробы 2
6 Аппаратура и посуда 5
7 Отбор проб 6
8 Приготовление испытуемой пробы 6
9 Методика 6
9.1 Контрольные пробы 6
9.2 Подготовка пробирок к испытаниям 6
9.3 Инкубация 6
9.4 Представление результатов 7
10 Подтверждение анализа (не обязательно) 7
10.1 Общие указания 7
10.2 Предполагаемое подтверждение бета-лактамов 7
10.3 Предполагаемое подтверждение сульфонамидов 7
10.4 Подтверждение других ингибиторов 8
11 Обработка результатов 8
12 Прецизионность 8
13 Протокол анализа 8
Приложение А (справочное) Данные совместных исследований 9
Приложение В (справочное) Приготовление суспензий тест-культуры микроорганизмов 10
Библиография 12

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Молоко и молочные продукты ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСТАТКОВ Метод диффузии в пробирке

Малако і малочныя прадукты ВЫЗНАЧЭННЕ АНТЫБАКТЭРЫЯЛЬНЫХ АСТАТКАЎ Метад дыфузіі ў прабірцы

Milk and milk products
Determination of antimicrobial residues
Tube diffusion test

Дата введения 2010-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает микробиологический ингибирующий метод определения разнообразных антибактериальных препаратов в молоке и молочных продуктах. Метод применим к сырому, термообработанному и восстановленному сухому молоку.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все изменения).

ISO 4833:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета микроорганизмов. Методика подсчета колоний при температуре 30 °С

ISO 7218:2007 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ISO 13969:2003 Молоко и молочные продукты. Руководство по нормированному описанию испытаний с использованием микробных ингибиторов

ISO 18330:2003 Молоко и молочные продукты. Руководящие указания по стандартному описанию иммунологических или рецепторных анализов для определения антибактериальных остатков

3 Термины и определения

3.1 антибактериальные субстанции (antimicrobial substances): Субстанции, которые оказывают ингибирующее действие при выполнении методики, установленной в настоящем стандарте.

3.2 предел обнаружения (limits of detection): Уровень концентрации, при котором обнаруживается определенный процент положительных проб.

Пример – 95 %.

4 Принцип метода

В две пробирки с агаровой средой, содержащие суспензию Geobacillius stearothermophilus ATCC 10149 (идентифицирован к NIZO штамму C953), добавляют пробу молока. Пробирки отличаются одна от другой значением pH, добавкой и антибиотиком. Конечным результатом инкубационного периода при нормальном росте микроорганизмов является изменение PH-среды, что приводит к изменению цвета индикатора в агаре от пурпурного до желтого. Если в испытуемом образце молока присутствуют субстанции (ингибиторы), которые замедляют рост микроорганизмов, цвет индикатора останется пурпурным, т. е. не изменится.

Пробирка А (pH 7,0; хлорамфеникол) имеет повышенную чувствительность к тетрациклиновым остаткам, пробирка В (pH 8,0; триметоприм) – к бета-лактамам, макролидам, аминогликозидам, сульфонамидам и триметоприму.

Издание официальное

5 Тест-культура микроорганизмов, питательная среда, стандартные растворы и контрольные пробы

Применяют реактивы только признанной аналитической квалификации, дистиллированную или деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты.

5.1 Тест-культура микроорганизмов

Используют суспензию Geobacillius stearothermophilus ATCC 10149 (идентифицирован к NIZO штамму C953) [1)], в которой количество жизнеспособных организмов приблизительно равно 5 000 000 колониеобразующих единиц на миллиметр (см. приложение В). Проверяют качество каждой новой партии суспензии тест-культуры микроорганизмов, определяя чувствительность стандартных растворов, перечисленных в таблице 1.

Таблица 1 – Стандартные растворы для определения чувствительности суспензии тест-культуры микроорганизмов

Стандартный раствор	Содержание, мкг/кг молока
Бензилпенициллин (пенициллин-G)	2
Сульфадиазин	150
Неомицин	30
Эритромицин	10
Окситетрациклин	100

Выполняют проверку стандартных растворов и контрольной пробы молока в 5 слоях в соответствии с методикой, описанной в разделе 9, определяют чувствительность суспензии тест-культуры микроорганизмов для бензилпенициллина и окситетрациклина в пробирке А (5.2.5) и чувствительность сульфадиазина, неомицина и эритромицина в пробирке В (5.2.6). Во всех пробирках должен быть получен положительный результат.

5.2 Питательная среда

Для улучшения воспроизводимости метода рекомендуется использовать обезвоженные основные компоненты или обезвоженную полную среду для приготовления питательной среды и выполнять инструкции изготовителя.

5.2.1 Основная среда

5.2.1.1 Компоненты

Казеин триптон	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Глюкоза, ангидрит	1,0 г
Агар	10 – 15 г
Вода	1 000 мл

Примечание – Основная обезвоженная среда имеет наименование Plate Count Agar.

5.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде при нагревании и корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации его значение находилось в диапазоне 7,0 ± 0,2. Выдерживают среду в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Приготовленная таким образом основная среда может храниться не более 3 мес в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

[1)] Суспензия Geobacillus stearothermophilus ATCC 10149 или штамм NIZO C953 является коммерческим доступным продуктом. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой данного продукта.

5.2.2 Раствор бромкрезолового пурпурного

5.2.2.1 Компоненты

Бромкрезоловый пурпурный	250 мг
Этанол 96 %	5 мл
Вода	100 мл

5.2.2.2 Приготовление

Растворяют бромкрезоловый пурпурный в этаноле и разбавляют водой до 100 мл.

Раствор бромкрезолового пурпурного можно хранить не более 6 мес в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.2.3 Раствор хлорамфеникола

5.2.3.1 Компоненты

Хлорамфеникол	20,0 мг
Метанол	5 мл
Вода	100 мл

5.2.3.2 Приготовление

Растворяют хлорамфеникол в метаноле и разбавляют водой до 100 мл.

Раствор хлорамфеникола можно хранить не более 1 мес в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.2.4 Раствор триметоприма

5.2.4.1 Компоненты

Триметоприм	25,0 мг
Этанол 96 %	5 мл
Вода	1 000 мл

5.2.4.2 Приготовление

Растворяют триметоприм в этаноле и разбавляют водой до 1 000 мл.

Раствор триметоприма можно хранить не более 1 мес в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.2.5 Пробирка А (pH 7)

Расплавляют основную среду (5.2.1) и охлаждают ее в водяной бане (6.3) до температуры (63 ± ± 1) °С. Добавляют 1,5 мл раствора хлорамфеникола (5.2.3) и 2 мл раствора бромкрезолового пурпурного (5.2.2) к 100 мл основной среды, предварительно нагретой на водяной бане при температуре (63 ± ± 1) °С, и хорошо перемешивают ее.

Доводят pH (6.5) среды, находящейся в водяной бане при температуре (63 ± 1) °С, до 7,0 ± 0,1 при данной температуре, используя 1 моль/л NaOH или 1 моль/л HCl.

Затем добавляют на 100 мл среды приблизительно 2 мл суспензии тест-культуры микроорганизмов (5.1), чтобы в течение 4 ч 15 мин с отклонением ±30 мин инкубации в водяной бане при температуре (63 ± 1) °С произошло изменение цвета среды, что говорит об отсутствии антибактериальных субстанций.

Смешивают и разделяют тест-среду на порции по 1 мл в пробирки (6.4) и оставляют среду для застывания.

Пробирка А с тест-культурой может храниться при температуре от 0 °С до 5 °С не более 3 дн, если пробирки закупорены во избежание испарения (например, парафином).

5.2.6 Пробирка В (pH 8)

Расплавляют основную среду (5.2.1) и охлаждают ее в водяной бане (6.3) до температуры (63 ± 1) °С. Добавляют 0,6 мл раствора триметоприма (5.2.4) и 2 мл раствора бромкрезолового пурпурного (5.2.2) к 100 мл предварительно нагретой основной среды во время выдерживания ее в водяной бане при температуре (63 ± 1) °С и хорошо перемешивают.

Доводят pH (6.5) среды, находящейся в водяной бане при температуре (63 ± 1) °С, до 8,00 ± 0,02 при данной температуре, используя 1 моль/л NaOH или 1 моль/л HCl. Следует проследить, чтобы во время этой процедуры значение pH не превысило 8,05.

Затем добавляют на 100 мл среды приблизительно 2 мл суспензии тест-культуры микроорганизмов (5.1), чтобы в течение 4 ч 15 мин с отклонением ±30 мин инкубации в водяной бане при температуре (63 ± 1) °С произошло изменение цвета среды, что говорит об отсутствии антибактериальных субстанций.

Смешивают и разделяют тест-среду на порции по 1 мл в пробирки (6.4) и оставляют ее для застывания.

Пробирка В с тест-культурой может храниться при температуре от 0 °С до 5 °С не более 3 дн, если пробирки закупорены во избежание испарения (например, парафином).

5.3 Стандартные растворы и контрольные пробы

Корректируют массу навески по чистоте и содержанию солей в соответствии с ISO 13969.

Для приготовления стандартных растворов и контрольных проб можно допустить, что 1 мл раствора равен 1 г.

5.3.1 Стандартные растворы бензилпенициллина и контрольные пробы

Принимая во внимание ограниченную стабильность бензилпенициллина, рекомендуется все стандартные растворы бензилпенициллина готовить свежими и заморозить контрольные пробы молока в тот же день до температуры ниже минус 18 °С.

5.3.1.1 Основной (исходный) стандартный раствор бензилпенициллина

Растворяют (20,0 ± 0,1) мг бензилпенициллина в 1 000 мл воды и смешивают. Основной (исходный) стандартный раствор содержит 20 мг/л бензилпенициллина.

Основной (исходный) стандартный раствор бензилпенициллина может храниться максимум 2 дн при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.3.1.2 Рабочий стандартный раствор бензилпенициллина

Разбавляют 10 мл основного стандартного раствора бензилпенициллина (5.3.1.1) водой до 1 000 мл и перемешивают. Рабочий стандартный раствор содержит 200 мкг/л бензилпенициллина.

5.3.1.3 Контрольная проба молока с бензилпенициллином

Разбавляют 1 мл рабочего стандартного раствора бензилпенициллина (5.3.1.2) молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4), до 100 мл и смешивают. Приготовленная контрольная проба молока содержит 2 мкг/л бензилпенициллина.

Контрольная проба молока с бензилпенициллином может храниться не более 2 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус 18 °С.

Примечание – 1 мг чистой соли калия пенициллина G эквивалентен 1 595 международным единицам пенициллина G. 1 мг чистой соли натрия пенициллина G эквивалентен 1 670 международным единицам пенициллина G.

5.3.2 Стандартные растворы окситетрациклина и контрольные пробы

5.3.2.1 Основной стандартный раствор окситетрациклина

Растворяют (5,0 ± 0,1) мг окситетрациклина в 10 мл раствора HCl 0,1 моль/л. Разбавляют до 100 мл водой и перемешивают. Стандартный раствор окситетрациклина содержит 50 мг/л окситетрациклина.

Стандартный раствор окситетрациклина может храниться не более 1 нед в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.3.2.2 Рабочий стандартный раствор окситетрациклина

Разбавляют 10 мл основного стандартного раствора окситетрациклина (5.3.2.1) водой до 100 мл и перемешивают. Рабочий стандартный раствор содержит 5 000 мкг/л окситетрациклина.

5.3.2.3 Контрольная проба молока с окситетрациклином

Разбавляют 2 мл рабочего стандартного раствора окситетрациклина (5.3.2.2) молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4), до 100 мл и смешивают. Приготовленная контрольная проба молока содержит 100 мкг/л окситетрациклина.

Контрольная проба молока с окситетрациклином может храниться не более 3 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус 18 °С.

5.3.3 Стандартные растворы сульфадиазина и контрольные пробы

5.3.3.1 Основной стандартный раствор сульфадиазина

Растворяют (15,0 ± 0,1) мг сульфадиазина в 100 мл воды и перемешивают. Стандартный раствор сульфадиазина содержит 150 мг/л сульфадиазина.

Стандартный раствор сульфадиазина может храниться не более 2 нед в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.3.3.2 Рабочий стандартный раствор сульфадиазина

Разбавляют 10 мл основного стандартного раствора сульфадиазина (5.3.3.1) водой до 100 мл и перемешивают. Рабочий стандартный раствор содержит 15 000 мкг/л сульфадиазина.

5.3.3.3 Контрольная проба молока с сульфадиазином

Разбавляют 1 мл рабочего стандартного раствора сульфадиазина (5.3.3.2) молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4), до 100 мл и смешивают. Приготовленная контрольная проба молока содержит 150 мкг/л окситетрациклина.

Контрольная проба молока с сульфадиазином может храниться не более 2 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус 18 °С.

5.3.4 Стандартные растворы неомицина и контрольные пробы

5.3.4.1 Основной стандартный раствор неомицина

Растворяют (30,0 ± 0,1) мг неомицина в 5 мл 0,1 моль/л буфера фосфатного (pH 8,0 ± 0,1) и перемешивают. Разбавляют до 1 000 мл водой и снова перемешивают. Стандартный раствор неомицина содержит 30 мг/л неомицина.

Стандартный раствор неомицина может храниться не более 2 нед при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.3.4.2 Рабочий стандартный раствор неомицина

Разбавляют 10 мл основного стандартного раствора неомицина (5.3.4.1) водой до 100 мл и перемешивают. Рабочий стандартный раствор содержит 3 000 мкг/л неомицина.

5.3.4.3 Контрольная проба молока с неомицином

Разбавляют 1 мл рабочего стандартного раствора неомицина (5.3.4.2) молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4), до 100 мл и смешивают. Приготовленная контрольная проба молока содержит 30 мкг/л неомицина.

Контрольная проба молока с неомицином может храниться не более 2 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус 18 °С.

5.3.5 Стандартные растворы эритромицина и контрольные пробы

5.3.5.1 Основной стандартный раствор эритромицина

Растворяют (20,0 ± 0,1) мг эритромицина в 5 мл метанола, разбавляют до 1 000 мл водой и снова перемешивают. Стандартный раствор эритромицина содержит 20 мг/л эритромицина.

Стандартный раствор эритромицина может храниться не более 2 нед при температуре от 0 °С до 5 °С.

5.3.5.2 Рабочий стандартный раствор эритромицина

Разбавляют 5 мл основного стандартного раствора эритромицина (5.3.5.1) водой до 100 мл и перемешивают. Рабочий стандартный раствор содержит 1 000 мкг/л эритромицина.

5.3.5.3 Контрольная проба молока с эритромицином

Разбавляют 1 мл рабочего стандартного раствора эритромицина (5.3.5.2) молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4), до 100 мл и смешивают. Приготовленная контрольная проба молока содержит 10 мкг/л эритромицина.

Контрольная проба молока с эритромицином может храниться не более 2 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус 18 °С.

5.4 Молоко, не содержащее антибактериальных остатков

Для получения молока, не содержащего антибактериальных остатков, используют метод, приведенный в ISO 13969, или используют UHT-стерилизованное цельное молоко, не содержащее веществ – ингибиторов микроорганизмов.

6 Аппаратура и посуда

Допускается использовать одноразовую посуду вместо стеклянной посуды, если она имеет соответствующие технические параметры.

Обычно применяется следующее микробиологическое лабораторное оборудование.

6.1 Автоклав для влажной стерилизации.

См. ISO 7218.

6.2 Микропипетки вместимостью 1 000 мкл.

6.3 Водяная баня с крышкой или закрытая, контролируемая термостатически, возможно с циркуляцией воды и поддержанием постоянной температуры (63 ± 1) °C, (70 ± 1) °C, (80 ± 1) °C соответственно.

6.4 Пробирки с тест-культурой диаметром приблизительно 16 мм и длиной приблизительно 80 мм.

6.5 pH-метр с точностью до ±0,01 единиц pH, оборудованный автоматическим корректором температуры и подходящими электродами для измерений в жидкой среде при температуре (63 ± 1) °C (например, электрод Ag/AgCl).

6.6 Аналитические весы с возможностью взвешивания навески до 0,1 мг, с ценой деления до 0,01 мг.

6.7 Штатив для удерживания пробирок с тест-культурой (6.4).

7 Отбор проб

Представительную пробу необходимо направить в лабораторию. Она не должна быть повреждена или претерпеть изменения во время транспортирования или хранения.

Процедура отбора проб не описана в настоящем стандарте. Рекомендованный метод отбора проб приведен в ISO 707.

8 Приготовление испытуемой пробы

Важно, чтобы пробы из жидкого молока были проанализированы немедленно. Пробы сухого молока перед испытанием необходимо растворить в дистиллированной воде.

9 Методика

9.1 Контрольные пробы

Устанавливают в каждый штатив для пробирок (6.7) пробирки, содержащие по 0,3 мл контрольной пробы молока, содержащего антибактериальные остатки, и пробы молока, не содержащего антибактериальных остатков:

a) пробирка A (5.2.5), содержащая контрольную пробу молока с бензилпенициллином (5.3.1.3);
b) пробирка A (5.2.5), содержащая контрольную пробу молока с окситетрациклином (5.3.2.3);
c) пробирка A (5.2.5) с молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4);
d) пробирка B (5.2.6), содержащая контрольную пробу молока с бензилпенициллином (5.3.1.3);
e) пробирка B (5.2.6), содержащая контрольную пробу молока с сульфадиазином (5.3.3.3);
f) пробирка B (5.2.6) с молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4);

Если анализируется большое количество проб и предполагается, что значительное большинство испытуемых проб не содержат антибактериальных веществ, эти пробы могут использоваться как молоко, не содержащее антибактериальных остатков.

9.2 Подготовка пробирок к испытаниям

9.2.1 Отмеряют пипеткой 10 мл испытуемой пробы в стеклянную пробирку, нагревают на водяной бане (6.3) при (80 ± 1) °C в течение 10 мин, для того чтобы инактивировать термолабильные натуральные ингибирующие вещества, и охлаждают быстро до комнатной температуры.

9.2.2 Отмеряют пипеткой 0,3 мл испытуемой пробы (9.2.1) в соответствующую маркированную стеклянную пробирку A (5.2.5) и в соответствующую маркированную стеклянную пробирку B (5.2.6).

9.2.3 Выдерживают пробирки A и B в штативе (6.7) при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы произошла диффузия молока.

9.2.4 Сливают молоко выше слоя агара и закрывают пробирку алюминиевой фольгой или пробкой для предотвращения испарения.

После диффузии молока можно поместить пробирки в водяную баню (6.3), нагретую до температуры 70 °C, на 10 мин, для того чтобы активировать споры «тепловым ударом».

9.3 Инкубация

Помещают пробирку (9.2.4) в водяную баню (6.3) при температуре (63 ± 1) °C и инкубируют при данной температуре в течение 4 ч 15 мин с отклонением ±30 мин, пока цвет в пробирке A или B с молоком, не содержащим антибактериальных остатков, не изменится от пурпурного к полностью желтому.

Цвет в пробирке A или B с контрольными пробами должен оставаться по меньшей мере светло-пурпурным к моменту извлечения. Затем извлечь все пробирки A и B из водяной бани и оставить их при комнатной температуре на 10 мин.

9.4 Представление результатов

Определяют и регистрируют цвет в пробирках, содержащих испытываемые пробы, следующим образом:

a) полностью или частично пурпурный цвет твердой испытательной среды в любой испытуемой пробе или в пробирке с контрольной пробой показывает присутствие веществ, ингибирующих рост тест-культуры микроорганизмов, и показывает положительный результат;

b) полностью желтый цвет твердой испытательной среды в любой испытуемой пробе или в пробирке с контрольной пробой показывает отсутствие веществ, ингибирующих рост тест-культуры микроорганизмов, и показывает отрицательный результат.

Цвет в пробирках с молоком, не содержащим антибактериальных остатков, должен быть желтым, в то время как пробирки, содержащие контрольные пробы молока, должны оставаться пурпурными. Если это не так, повторить анализ. Если повторно происходит отклонение цвета в пробирках с контрольными пробами молока и /или с молоком, не содержащим антибактериальных остатков, необходимо установить причину.

10 Подтверждение анализа (не обязательно)

10.1 Общие указания

Методика подтверждения анализа присутствия бета-лактама и сульфонамидадных остатков описана в [4]. Дальнейшие указания приведены в 10.2 и 10.3.

Примечание – Присутствие сочетания антибиотиков и/или других ингибиторов в испытуемой пробе может привести к трудностям в предполагаемом подтверждении.

10.2 Предполагаемое подтверждение бета-лактамов

Пробы с положительным тестом в пробирке А (5.2.5) или в пробирке В (5.2.6) могут быть проанализированы на присутствие остатков пенициллина и цефалоспорина с использованием бета-лактамазы. Присутствие остатков бета-лактама может рассматриваться, если активность ингибитора в пробах, обработанных бета-лактамазой, нейтрализована.

Можно отметить два типа энзимов бета-лактамазы:

– пенициллиназа (активность бета I), которая более активна в деградирующих пенициллинах;

– цефалоспориназа (активность бета II), которая более активна в деградирующих цефалоспоринах.

Пример – Методика анализа молока с пенициллиназой. Добавляют 2 мл концентрата пеназы, содержащего 10 000 000 международных единиц пеназы/мл (имеется от Bectona, Dicinsona and Company [2]), к 100 мл испытуемой питательной среды в пробирку А (5.2.5) до установления pH. Смешивают и распределяют испытуемую питательную среду в 1 мл порции в пробирке и оставляют питательную среду застывать. Затем выполняют методику анализа в соответствии с разделом 9.

Некоторые бета-лактамы (например, цефалексин) менее чувствительны к бета-лактамазе. В таких случаях рекомендуется дополнительная обработка пробы молока (1 мл испытуемой пробы с 0,3 мл концентрата пеназы при 37 °С в течение 2 ч).

10.3 Предполагаемое подтверждение сульфонамидов

Пробы с положительным тестом в пробирке В (5.2.6) могут быть проанализированы на присутствие остатков сульфонамидов с использованием раствора пара-аминобензойной кислоты (ПАБК). Присутствие остатков бета-лактама может рассматриваться, если активность ингибитора в пробе, обработанной ПАБК, нейтрализована.

Пример – Добавляют 2 мл раствора ПАБК (5 г/кг воды) к 100 мл испытуемой питательной среды в пробирку В (5.2.6) после добавления испытуемого организма до установления pH. Смешивают и распределяют испытуемую питательную среду в 1 мл порции в пробирке и оставляют питательную среду застывать. Затем выполняют методику определения в соответствии с разделом 9.

---

[2] Примером продукта, имеющегося на рынке, является концентрат пеназы, выпускаемый фирмой Becton, Dicinson and Company. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой данного продукта.

10.4 Подтверждение других ингибиторов

Если ингибирующее вещество не идентифицировано ни как бета-лактам, ни как сульфонамид, требуется дальнейшая идентификация с применением других тестов, таких как микробиологические многопластинчатые системы анализа, иммунологический анализ или химические методы (HPLC, LGMS) (см. ISO 18330).

11 Обработка результатов

Отмечают присутствие или отсутствие антимикробных веществ.

12 Прецизионность

Пределы обнаружения некоторых антибиотиков в молоке с использованием метода диффузии в пробирке приведены в приложении А.

13 Протокол анализа

Протокол анализа должен содержать:

a) информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) используемый метод отбора проб;

c) используемый метод определения со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности выполнения методики, не описанные в настоящем стандарте, или выборочные наряду с любыми ошибками, которые могут оказать влияние на результат (ы) анализа;

e) полученные результат (ы) анализа.

Приложение А
(справочное)

Данные совместных исследований

Пределы обнаружения в микрограммах на килограмм молока для метода двух пробирок – пробирки А (pH7) и пробирки В (pH8) – были получены в результате нескольких совместных исследований [3] с участием трех квалифицированных лабораторий. Результаты приведены в таблицах А.1 – А.5.

Таблица А.1 – Бета-лактамы

Бета-лактамы	Пробирка А, мкг/кг	Пробирка В, мкг/кг
Бензилпенициллин	2	3
Амоксициллин		3
Клоксациллин		20
Цефтиофур		50
Цефалексин		80

Таблица А.2 – Макролиды

Макролиды	Пробирка А, мкг/кг	Пробирка В, мкг/кг
Эритромицин		10
Спирамицин		200
Тилозин		20

Таблица А.3 – Аминогликозиды

Аминогликозиды	Пробирка А, мкг/кг	Пробирка В, мкг/кг
Дигидрострептомицин		70
Неомицин		30
Канамицин		500
Гентамицин		20

Таблица А.4 – Тетрациклины

Тетрациклины	Пробирка А, мкг/кг	Пробирка В, мкг/кг
Окситетрациклин	100	400
Тетрациклин	100	300
Доксициклин	100	
Хортетрациклин	200	> 800

Таблица А.5 – Сульфонамиды

Сульфонамиды	Пробирка А, мкг/кг	Пробирка В, мкг/кг
Дапсон		2
Сульфаметазин		400
Сульфадиазин		150

Приложение В
(справочное)

Приготовление суспензий тест-культуры микроорганизмов

В.1 Тест-культура микроорганизмов

Получают культуру Geobacillius stearothermophilus ATCC 10149 (идентифицирован к NIZO штамму C953), например от ATCC (gost.e-ecolog.ru [3]) или из другого источника.

В.2 Исходная культура

В.2.1 Скошенный агар

В.2.1.1 Состав

Экстракт дрожжей	2 г
Пептон	5 г
Экстракт мяса	1 г
Хлорид натрия (NaCl)	5 г
Сульфат марганца ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	35 мг
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1 000 мл

Примечание – Смесь обезвоженных основных компонентов без сульфата марганца имеется в продаже и называется питательным агаром.

В.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде при нагревании, доводя после стерилизации pH до значения 7,4 ± 0,1 и выдерживают в автоклаве при температуре (121 ± 1) °C в течение 15 мин.

Перед затвердеванием помещают в стерильные и закупоренные стеклянные пробирки (приблизительно 10 мл) и оставляют агар затвердевать на скошенной среде.

В.2.2 Хранение тест-культуры микроорганизмов

В пробирку со скошенным питательным агаром (В.2.1) с помощью петли просевают штрихом тест-культуру ATCC, плотно закрыв пробирку стерильной пробкой, и термостатируют ее в течение 48 ч при температуре при (63 ± 1) °C. После инкубации стерилизуют пламенем пробку пробирки, затем немного продвигают ее в пробирку и закрывают стерильной резиновой пробкой. Пробирка с исходной культурой, полученная таким образом, может быть выдержана несколько месяцев в холодильнике при температуре 5 °C или как тест-организм суспензия в морозильнике при температуре ниже минус 20 °C.

В.3 Получение спор тест-культуры микроорганизмов

В.3.1 Переносят 20 мл расплавленного скошенного агара (В.2.1) асептически в стерильную чашку Петри на 140 мм и охлаждают до комнатной температуры.

В.3.2 Используя стерильную пипетку, добавляют 5 мл дистиллированной воды в пробирку с исходной культурой (В.2.2). Приготавливают суспензию тест-культуры микроорганизмов, осторожно соскабливая культуру со скошенного агара с помощью петли и промывая ее в пробирке с исходной культурой.

В.3.3 Используя стерильную пипетку, добавляют 0,5 мл суспензии тест-культуры микроорганизмов (В.3.2) в чашку Петри с затвердевшим (застывшим) агаром (В.3.1). Иннокулируют (засевают) всю поверхность равномерно с помощью стеклянной лопатки (шпателя).

В.3.4 Выдерживают в инкубаторе при температуре (63 ± 1) °C в течение 72 ч.

В.3.5 Используя стерильную пипетку, добавляют стерильный физиологический пептонно-солевой раствор (8,5 г NaCl и 1,0 г пептона/кг воды) к культуре в чашке Петри (В.3.4). Распределяют ее над поверхностью с помощью стеклянной лопатки. Собирают суспензию тест-культуры микроорганизмов в стерильную бутыль. Закрывают бутыль и тщательно ее встряхивают.

[3] Данная информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта (см. также сноску 1).

B.3.6 Промывают суспензию, центрифугируя ее при 2 000 g в течение 5 мин. Декантируют надосадочную жидкость и ресуспендируют клетки в физиологическом пептонно-солевом растворе. Выполняют эту стадию дважды.

B.3.7 Суспендируют клетки в физиологическом пептонно-солевом растворе. Нагревают в течение 10 мин при температуре (80 ± 1) °C для стимулирования создания спор.

B.4 Доведение концентрации суспензии тест-культуры микроорганизмов

Доводят концентрацию суспензии тест-культуры микроорганизмов таким образом, чтобы достичь приблизительно 5 000 000 колониеобразующих единиц на миллилитр, как установлено при определении количества микроорганизмов в агаре посевом на чашках Петри в течение 18 – 24 ч при температуре (63 ± 1) °C (см. ISO 4833).

B.5 Хранение суспензии тест-культуры микроорганизмов

Разливают небольшими порциями и хранят при температуре ниже минус 20 °C не более 1 года.

Библиография

[1] ISO 707 IDF 50 Milk and milk products – Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[2] NOUWS, J.F.M., L.OEFFEN, G., SCHOUTEN, J., VAN EGMOND, H., KEUKENS, H. and STEGEMAN, H. Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of antibiotic residues and sulphonamides in raw milk. Archiv fur Lebensmittelhygiene, 46, 1995, pp. 140-141

[3] Instruction manual for the testing of herd bulk milk samples. Netherlands Milk Control Station (MCS Nederland), Zutphen, 2003 (in Dutch)

[4] Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. IDF Bulletin, 258, 1991

[5] Suhren, G. and Beukers, R. Delvotest S.P. for the detection of cloxacillin and sulfamethoxazole in milk. IDF interlaboratory study. J. AOAC Int. 81, 1998, pp. 978-990

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 25.02.2010. Подписано в печать 10.03.2010. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,86 Уч.- изд. л. 0,78 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552634 от 17.11.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru