ГОСУДАРСТВЕННОЕ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СБОРНИК

МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА ОТ 12.06.08 №88-ФЗ

«Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 12

МОСКВА 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 12

ББК 51.23
С23

С23 **Сборник** методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию».—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—76 с.

ISBN 5—7508—0771—1

В сборник включены методические документы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, а также правила отбора образцов для проведения исследований (испытаний) и измерений, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко от 08.12.2008 № 67.

Настоящие «Методические указания» предназначены санитарно-эпидемиологических станций Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР к лабораторий других министерств и ведомств занижающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

«Методические указания» подготовлены Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Министерства здравоохранения СССР, Государственной комиссией по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при Министерстве сельского хозяйства СССР, Всесоюзным научно-исследовательским институтом гигиены и токсикологии пестицидов (лаборатория аналитической химии пестицидов и лаборатория кибернетических исследований пестицидов в окружающей среде), Всесоюзным научно-исследовательским институтом химических средств защиты растений (сектор анализа пестицидов).

ББК 51.23

Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 16.12.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,75

Тираж 200 экз. Заказ 100

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

Унифицированные правила отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов 4

Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях методом хроматографии в тонком слое 29

Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства 46

Методика определения афлатоксинов в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии 69

Утверждаю
Заместитель Главного
государственного санитарного
врача СССР
А. И. ЗАИЧЕНКО
29 июня 1984 г. № 3049—84

Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства

В целях дальнейшей интенсификации животноводства и птицеводства, повышения производства мяса и других продуктов животного происхождения в сельском хозяйстве нашей страны применяются антибиотики для стимуляции роста, повышения эффективности откорма скота и птицы, а также в качестве лечебно-профилактических средств. Среди них препараты, содержащие тетрациклин, пенициллин, стрептомицин, немедицинские антибиотики гризин, цинкбацитрацин и прочие.

Условия применения антибиотиков для выращивания, откорма и лечения сельскохозяйственных животных и птицы регламентированы Инструкцией, утвержденной МСХ СССР в 1980 г. и Методическими указаниями по применению антибиотиков в ветеринарии (М., 1973 г.), соблюдение которых должно гарантировать безопасность для здоровья населения продуктов, полученных от леченных или стимулированных антибиотиками животных. Однако в силу различных причин в пищевых продуктах, полученных от этих животных в ряде случаев содержатся остатки антибиотиков.

Антибиотики тетрациклинового ряда могут попадать в продукты питания в результате неправильного использования их в качестве и лечебных средств. Наличие в молоке стрептомицина, пенициллина и др. обусловлено чаще всего использованием для лечения маститов коров препаратов длительного действия на масляной основе. Присутствие немедицинских антибиотиков (гризина и пр.) отмечено при включении в корма в экспериментальных условиях в превышенных количествах этих препаратов. Материалы научных исследований свидетельствуют о наличии остаточных количеств антибиотиков в мясных, молочных продуктах, яйцах. Вместе с тем, длительное использование в пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, может вызвать неблагоприятные для здоровья человека последствия – аллергические реакции, дисбактериоз, образование и передачу резистентных форм мик-

робов. Экспериментально установленные при этом уровни неблагоприятного действия антибиотиков на организм позволили обосновать величины максимально-допустимого суточного поступления их в организм человека с продуктами питания и сделать вывод, что *при санитарном контроле продуктов питания остаточные количества антибиотиков в них не должны допускаться при использовании предлагаемых ниже утверждённых методов исследования в пределах их чувствительности* /для хлортетрациклина пенициллина – 0,01, стрептомицина – 0,5, гризина и цинкбацитрина – 0,1 и 0,02 ЕД на г/мл/продукта).

Повышение эффективности санитарного надзора по предупреждению попадания в продукты питания антибиотиков должно осуществляться путем периодического отбора на мясокомбинатах, молочных заводах, в животноводческих и птицеводческих хозяйствах, торговой сети проб молока, молочных продуктов, мяса, субпродуктов, яиц для определения в них антибиотиков. Необходимо выявлять хозяйства, поставляющие пищевые продукты, загрязненные антибиотиками, выявлять причины попадания в них антибиотиков и принимать меры для устранения этих нарушений, не допускать снабжения пищевыми продуктами, содержащими остаточные количества антибиотиков, детских учреждений, больниц и т. п.

Реализация молока с наличием остаточных количеств антибиотиков решается в каждом конкретном случае представителями Государственного санитарного и ветеринарного надзора.

Молоко, содержащее остаточные количества любых антибиотиков, может использоваться в качестве дополнительного кормового средства при откорме молодняка сельскохозяйственных животных.

Творог, сметану, яйца содержащие остаточные количества антибиотиков тетрациклинового ряда, пенициллина, следует направлять на изготовление хлебобулочных и кондитерских изделий с расчетом, чтобы соотношение «загрязненных продуктов» с другими компонентами изделий было не меньшим, чем 1 : 4 /при содержании остаточных количеств антибиотиков до 0,05 ЕД/г/, 1 : 10 и 1 : 100 – при содержании остаточных количеств антибиотиков до 0,1 ЕД/г и до 1,0 ЕД/г и более, соответственно.

Мясо и субпродукты, содержащие остаточные количества антибиотиков, не следует в необработанном виде реализовывать населению. Такое мясо должно направляться на изготовление мясных, мясорастительных консервов, за исключением консервов для детского питания, концентратов I и II блюд, вареных и варено-копченых колбас при условии

обязательной подсортировки к мясу или компонентам блюд, не содержащих остаточных количеств антибиотиков. Средне-расчетная кратность разведения «загрязненного» антибиотиками мяса незагрязненным должна составлять 17 /по данным Института питания АМН СССР/. В каждом конкретном случае вопрос о реализации и использовании мяса с наличием остаточных количеств антибиотиков решается представителями Государственного санитарного и ветеринарного надзора с условием, что при подсортировке кратность соотношения «загрязненных» и незагрязненных продуктов должна зависеть от выявленной концентрации антибиотика, с тем, чтобы в конечном итоге содержание остаточного количества антибиотика было ниже уровня чувствительности утвержденных методов исследования.

Например, в образцах мышечной ткани от говяжьей туши № « », поступившей на забой из с-х «... -окий», выявлено содержание хлортетрациклина на уровне 0,2 ЕД/г. Следовательно, чтобы содержание антибиотика в продукте снизилось до менее 0,01 ЕД/г, мясо от этой туши должно быть направлено на приготовление колбас при условии введения в фарш в размере не более 5 % к общей массе продукта. В совхоз должно быть направлено предписание о нарушении инструкций по применению антибиотиков в ветеринарии или при откорме животных, а к руководителю хозяйства приняты административные меры.

При реализации продуктов питания, содержащих остаточные количества стрептомицина, гризина, цинкбацитрацина, должен использоваться такой же подход подсортировки к незагрязненному антибиотиками сырью с учетом выявленной концентрации антибиотика и соответствующей кратностью разведения.

Обеспечить полную безопасность продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, для потребителей может только четкая организация проведения гигиенических мероприятий, строгий контроль за применением антибиотиков в животноводстве и ветеринарии и выявление их в продуктах питания животного происхождения с помощью чувствительных методов.

В целях систематического контроля в стране за загрязнением продуктов животноводства антибиотиками предлагаются данные «Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства». Наиболее широкое применение как в научных исследованиях, так и в практических учреждениях, нашли микробиологические методы, позволяющие определять минимальные концентрации антибиотиков в исследуемом материале. Они основаны на непо-

средственном биологическом действии антибиотиков на чувствительные штаммы микроорганизмов и поэтому наиболее специфичны и объективны. Ниже рекомендуются методы определения некоторых антибиотиков:

а) тетрациклиновой группы – в молоке, молочных продуктах, яйцах, мясе, мясных продуктах, в т. ч. мясе и субпродуктах птицы;

б) стрептомицина – в молоке и молочных продуктах, яйцах;

в) пенициллина – в молоке и молочных продуктах;

г) гризина – в мясе;

д) цинкбацитрацина – в мясе.

Содержание антибиотиков выявляют микробиологическим методом диффузии в агар по величине торможения роста следующих тест-культур, внесенных в питательные среды:

– для тетрациклиновых антибиотиков – Bac. cereus ATCC 11778 / чувствительность – 0,01 ЕД/г/мл/;

– для стрепомицина – Bac. micoidis 537 /чувст. 0,5 ЕД/г/мл/;

– для пиницилина – *S. lutea* ATCC 9341 /чувст. 0,01 ЕД/г/мл/;

– для гризина – Bac. cubtilis ATCC 6633/чувст. 0,5 ЕД/г/мл/;

– для цинкбацитрацина – M. flavus ATCC 10240 /чувст. 0,02 ЕД/г/мл/.

Молоко рекомендуется исследовать на присутствие остаточных количеств антибиотиков в том случае, когда при предварительном исследовании по ГОСТ 23454-79 в нем обнаружены ингибирующие вещества и исключено наличие химических веществ.

ОТБОР ПРОБ, САНИТАРНЫЙ КОНТРОЛЬ И ОТЧЕТНОСТЬ

Отбор проб молока и молочных продуктов производится по ГОСТ 13928-68 и 9225-68, но не более 50 мл каждой пробы; мяса и мясных продуктов по ГОСТ 7269—79, но не более 50 гр. каждой пробы; яйца отбирают в пределах 0,5—1 % /в зависимости от объема партии/.

Санитарный контроль за содержанием антибиотиков в молочных, мясных продуктах, яйцах следует проводить не реже 1 раза в квартал. Количество проб для анализа и перечень антибиотиков определяют в зависимости от состояния вопроса в каждой местности. Органы ветнадзора должны информировать санитарно-эпидемиологическую службу о применяемых в данном районе, области в животноводческих хозяйствах антибиотиках в качестве кормовых или лечеб*ных* препаратов.

В случае обнаружения антибиотиков в пищевых продуктах необходимо применять административные меры к руководителям хозяйств за нарушение Инструкций по применению антибиотиков в ветеринарии и

при, выращивании скота. Врачам по гигиене питания, специалистам ведомственной санитарной службы, ветнадзора следует проводить разъяснительную работу о недопустимости загрязнения пищевых продуктов остаточными количествами антибиотиков.

Материалы по результатам исследований продуктов животноводства на загрязнение антибиотиками в целом по району, области, республике должны ежегодно обобщаться и анализироваться в целях принятие конкретных профилактических мер.

1. АППАРАТУРА

1. Автоклав /стерилизатор паровой/, ГОСТ 19569—74.

2. Бумага масштабно-координатная марки ПЛН ГОСТ 334—73 / полулогарифмическая сетка для расчета активности растворов антибиотиков/.

3. Весы лабораторные равноплечие ВЛР-200 г ТУ 25.06.1131—75.

4. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 1 х 10^{-3} – 0,2 кг по ГОСТу 24104–80.

5. Водяная баня лабораторная /Аппарат для инактивирования сыворотки крови МРТУ 42.1091—63/.

6. Горелка газовая или спиртовая по ГОСТу 10090—74.

7. Ионометр универсальный /pH-метр/ ЭВ-74.

8. Колбы стеклянные конические вместимостью 50, 100, 200, 1000 $см^3$ по ГОСТу 10394—72.

9. Линейка по ГОСТу 17435—72.

10. Матрацы стеклянные лабораторные вместимостью 1000 $см^3$.

11. Мерные колбы и стаканы стеклянные лабораторные на 50, 100, 500 и 1000 $ом^3$ по ГОСТу 23932—79.

12. Микроскоп МБИ или МБР по ГОСТу 8284—78.

13. Микроразмельчитель тканей типа РТ-2 МРТУ 04.1.1505—63 /или фарфоровая ступка с пестиком по ГОСТу 9147—73 и кварцевый песок/.

14. Ножницы по ГОСТу 21239—77, скальпель ГОСТ 21240—77, пинцеты по ГОСТу 31241—77.

15. Палочки стеклянные

16. Петля бактериологическая

17. Пробочное сверло 9 мм

18. Пипетки измерительные градуированные вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 $см^3$ по ГОСТу 20292—74.

19. Пробирки стеклянные химические 16 мм по ГОСТу 23932—79.

20. Пробирки центрифужные емкостью 10 $см^3$.

21. Стеклянный стандарт мутности для оптической стандартизации бактерийных взвесей.

22. Сушильный шкаф круглый по ТУ 64-1-1411.

23. Термостаты электрические с водяной рубашкой по МРТУ 421878—60.

24. Трафарет для вырезания лунок.

25. Уровень для установления горизонтальной поверхности.

26. Холодильник бытовой по ГОСТу 16317—70.

27. Центрифуга лабораторная стационарная ЦЛС-31М по ГОСТу 51107—71; центрифуга настольная ЦЛН-2 МРТУ 421742—63.

28. Цилиндры мерные на 50, 100, 250, 1000 $см^3$ по ГОСТу 1770—74.

29. Чашки биологические стеклянные тип Петри по ГОСТу 23932—79, а также чашки из полимерных материалов.

30. Штативы для пробирок на 20—40 гнезд по ТУ 64-1-2669—78.

2. КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. Агар-агар микроскопический по ГОСТу 17206—71

2. Мясо-пептонный бульон по ГОСТу 20730—75

3. Дрожжевой экстракт /экстракт кормовых дрожжей, сухой производство МНИИВС/

4. Мясная вода по ГОСТу 20729—75

5. Панкреатический гидролизат казеина

6. Пепсин медицинский

7. Пептон сухой ферментативный ГОСТ 13805—76

8. Бульоны Хоттингера с содержанием аминного азота 33 мг%, 100 мг%, 130—140 мг% по ГОСТу 10444.1—75

3. РЕАКТИВЫ

1. Глюкоза кристаллическая ХЧ по ГОСТу 975—76
2. Вода дистиллированная ГОСТ 6709—72
3. Натрия гидрат окиси /натр едкий/ ГОСТ 4328—66, 10 р-р
4. Натрия лимоннокислый, х.ч. ГОСТ 22280—76
5. Калия фосфат однозамещенный, х.ч. ГОСТ 4198—65
6. Калия фосфат двухзамещенный, х.ч. ГОСТ 2493—65
7. Натрия фосфат двухзамещенный, х.ч. ГОСТ 11773—66
8. Спирт этиловый, ректификованный по ГОСТ 5262—67
9. Кислота соляная, х.ч. уд. вес 1.18—1.19
10. Натрий хлористый, х.ч. по ГОСТу 4233—77
11. Стандарты антибиотиков производства ГИСК им. Л.А.Тарасевича

4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Среда № 1

Дистиллированная вода	– 10,0 мл	Стерилизация автоклавированием
Агар-агар	– 6,0 г ± 0,1	при 121 °С ± 1 °С
pH среды	– 8,0	20 мин ± 3 мин

Среда № 2

Пептон	– 10,0 г	Стерилизация автоклавированием
Хлористый натрий	– 5,0.г	при 121 °С ± 1 °С
Агар-агар	– 20,0 т	20 мин ± 3 мин
Мясная вода 1 : 2	– до 1000 мл	
pH среды	– 7,0 ± 0,1	

Среда №3

Бульон Хоттингера с содержанием аминного азота100 мг% – 1000 мл
Агал-агар 20,0 ± 0,1
Глюкоза /добавляют в расплавленный агар 40 % глюкозу в количестве 2,5 мл на 100 мл среды/

pH среды после стерилизации 6,4 ± 0,1	Стерилизация автоклавированием при 121 °С ± 1 °С 20 мин ± 3 мин

Среда № 4

Бульон Хоттингера с содержанием аминного азота 33 мг% – 1000 мл

Агар-агар	– 25,0 ± 0,1 г	Стерилизация автоклавированием
pH среды	– 6,1 ± 0,1	при 12I °С ± 1 °С
		20 мин ± 3 мин

Среда № 5

Бульон Хоттингера с содержанием аминного азота 33 мг% – 1000 мл

Агар-агар	– 20,0 ± 0,1 г	Стерилизация автоклавированием
$NaHPO_4$	– 2,5 ± 0,05 г	при 121 °С ± 1 °С
pH среды	– 7,9 ± 0,1	20 мин ± 3 мин

Среда № 6

Пептон	– 10,0 ± 0,1 г	Стерилизация автоклавированием
Натрий, хлористый	– 5,0 ± 0,05 г	при 121 °С ± 1 °С
Агар-агар	– 20,0 ± 0,1 г	20 мин +3 мин
Мясная вода 1 : 2	– до 1000 мл	
pH среды	– 6,5 ± 0,1	

Среда № 7

Пептон – 6,0 ± 0,1 г
Панкреатический гидролизат казеина, сухой – 4,0 ± 0,05 г. /или 40,0 ± 1 мл жидкого/
Дрожжевой экстракт, сухой – 3,0 ± 0,05 г /или 30,0 ± 1 мл жидкого/
Мясной экстракт, сухой – 1,5 ± 0,01 г /или 15,0 ± 0,5 мл мясной воды/
Глюкоза – 1,0 ± 0,01 г
Агар-агар – 20,0 ± 0,1 г
Вода дистиллированная – до 1000 мл
pH среды – 6,5 ± 0,1

Стерилизация автоклавированием при 115 °С ±3 °С – 20мин ± 3 мин

Среда № 8

Мясная вода 1 : 2 – 500 ± 1 мл
Пептон – 5,0 ± 0,05 г
Хлористый натрий – 2; 5 г
Фосфат калия двухзамещенный – 3,0г
Агар-агар – 6,0
Вода дистиллированая до 1000 мл
pH среды – 7,8—8,0

Стерилизация автоклавированием при 121 °С ± 1 °С – 20 мин ± 3 мин

5. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ
для экстракции антибиотиков из исследуемого материала

1. Физиологический раствор
   NaCl – 8,5 г
   H_2O – до 1 л

Стерилизация автоклавированием при 121 °С ± 1 °С – 20 мин ± 3 мин

2. Цитратно-солянокислый, pH 5,1 ± 0,1
   лимонно-кислый натрий – 20,6 г
   HCl, уд. вес 1,19 – 1,81 мл
   H_2O – до 1 мл

Стерилизация автоклавированием при 121 °С ± 1 °С 20 мин ± 3 мин

3. 2 % раствор пепсина на цитратно-солянокислом буфере с pH 5,1 ± 0,1
   пепсин медицинский – 2 г
   буфер – 100 мл

/Асептично взвешенную навеску пепсина вносят в стерильный буфер перед проведением анализа/

4. Фосфатный буфер, pH 6,0
   KH_2PO_4 – 7,72 г или KH_2PO_4 – 2 г
   $NaHPO_4$ – 1,78 г K_2HPO_4 – 8 г
   H_2O – до 1 л H_2O – до 1 л

Стерилизация автоклавированием при 121 °С ± 1 °С 20 мин ± 3 мин

5. 2 % раствор пепсина на фосфатном буфере с pH 6,0

пепсин медицинский	– 2 г	/Асептично взвешенную навеску
буфер	– 100 мл	Пепсина вносят в стреильный буфер перед проведением анализа/

6. Фосфатный буфер pH 7,9 ± 0,1 — Стерилизация автоклавированием при 121 °С ± 1 °С – 20 мин ± 3 мин

K_2HPO_4 – 16,73 г

KH_2PO_4 – 0,523 г

H_2O – до 1 л

7. Цитратно-солянокислый, pH 3,1 ± 0,1

I раствор – 22,6 г лимоннокислого натрия растворяют в 1 л воды;

II раствор – 8,2 мл конц. HCl с уд. весом 1,19 растворяют в 1 л дистиллированной воды

Буфер готовят при смешивании двух растворов;

62 мл I раствора + 100 мл II раствора, pH буфера 3,0 ± 0,1

Стерилизация – 121 °С ± 1 °С – 20 мин ± 3 мин.

6. ВЫРАЩИВАНИЕ ТЕСТ-КУЛЬТУР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

Тест-культурами служат специально отобранные, образующие и необразующие опоры, непатогенные или условнопатогенные штаммы микроорганизмов, обладающие высокой чувствительностью к антибиотикам. Они должны хорошо расти на применяемых средах, образуя сплошной газон и четко очерченные зоны задержки роста в местах диффузии антибиотиков в агар.

6.1. Приготовление спор Bac. cereus АТСС 11778

Культуру высевают в пробирки со скошенный агаром /2 % МПА, pH 7,1 ± 0,1/ и выращивают при 29,0 ± 1,0 °С в течение 20,0 ± 2,0 часов. Эту культуру смывают со скошенного агара 8,0 ± 2,0 мл стерильной дистиллированной воды. Весь объем образовавшейся суспензии вносят в матрацы с 200 ± 1,0 мл 2 % МПА и выращивают в течение 7 дней при температуре 30 °С. Через 7 суток из культуры готовят мазки, окрашивают по Граму и, если в поле зрения содержится 80—90 % спор, культуру смывают 50 мл стерильной дистиллированной вода. Взвесь спор прогревают на водяной бане при 65—70 °С в течение 30,0 ± 1,0 мин, трижды центрифугируют при 3 тыс. оборотов в минуту в течение 10 мин, каждый раз промывая осадок стерильной дистиллированной водой до полу-

чения прозрачной надосадочной жидкости. Промытую взвесь спор прогревают вновь на водяной бане 30,0 + 1,0 мин при 65—70 °С. Полученную взвесь спор стерильно разливают в пробирки или ампулы, запаивают и хранят при температуре не выше 4 °С и используют до тех пор, пока споры образуют хороший газон и четко очерченные края зон.

6.2. Приготовление рабочей концентрации Bac cereus ATCC 11778.

Небольшое количество /0,2 мл/споровой взвеси Bac. cereus вносят в стандартную пробирку с 5 мл стерильного физиологического раствора и хорошо перемешивают. По стандарту мутности на 5 ед полученную взвесь доводят до концентрации 5×10^8 микробных тел в 1 мл. Затем 0,2, мл данной взвеси вносят в 100 мл расплавленной и охлажденной до 60 ° питательной среды. В итоге нагрузка тест-культуры в питательной среде составляет 10^6 спор в 1 мл.

6.3. Выращивание спор Bac.micoidis 537.

Культуру пересевают на скошенный агар /2 % МПА, среда № 2, pH 7,9 ± 0,1/ и выращивают при 37 °С в течение 20 ± 2,0 часа. В мазках культуры должны быть обнаружены грамположительные палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или цепочками. Затем эту культуру со скошенного агара смывают 7 ± 2,0 мл стерильной дистиллированной воды. Образовавшуюся суспензию вносят в матрацы с 2 % агаризированной средой, приготовленной на бульоне Хоттингера с содержанием 33 мг% аминного азота, pH 6,1 ± 0,1 /среда № 4/. Засеянные матрацы выдерживают при 37 °С в течение 7 дней, после чего готовят мазки и, если в мазках, окрашенных по Граму, имеется в поле зрения 85 ± 5,0 % спор, культуру смывают стерильной дистиллированной водой.

Полученную взвесь спор прогревают при 65—40 °С в течение 30 мин, а затем поступают также, как и при получении спор. Bac. ATCC 11778, п. 6.1.

Таблица 1

Тест-культуры, питательные среды, буферные растворы, рабочие концентрации стандартов антибиотиков, применяемые для определения антибиотиков в пищевых продуктах

Антибиотик	Тест-микроб	Ориентировочная посевная доза на 1 мл среды	Питательные среды	Буферные растворы	Кол-во среды на чашку	Рабочая концентрация стандарта антибиотика в мкг/мл
Тетрациклины	Bac.cereus ATCC 11778	1 млн спор	№ 2, № 3	№ 2, № 3	10 мл	0,05
Стрептомицин	Bac. mycoidis 537	20 млн спор	№ 2, № 4	№ 4, № 6	10 мл	2,0
Пенициллин	Sur. lutea ATCC 9341	15 млн микробных тел	№ 7	№ 4, № 5	10 мл	0,05
Гризин	Bac. cubtilis ATCC 6633	5 млн спор	№ 5, № 6, № 8,	№ 1, № 7	10	0,4
Цинкбацитрацин	M. flavus ATCC 10240	10 млн микробных тел	№ 6		10	0,1

6.4. Приготовление рабочей концентрации Bac. mycoidis 537

В стандартную пробирку с 5 мл стерильной дистиллированной воды добавляют 0,1—0,2 мл взвеси спор Bac. mycoidis 537 и по стандарту мутности на 10 ед разводят споры до 1 млрд микробных тел в 1 мл. Взвесь спор вносят в охлажденную до 60 °С питательную среду из расчета 20 млн спор в 1 мл среды, т. е. 2 мл 1 млрд взвеси в 100 мл среды.

6.5. Выращивание S. lutea ATCC 9341 и приготовление микробной взвеси

Культуру выращивают в течение 20 ± 2,0 час. в пробирках со средой № 7, после чего её смывают стерильным физиологическим раствором и хранят при 4 °С. Микробную взвесь суточной культуры разводят до 1 млрд микробных тел также, как и Bac. mycoidis 537. Готовую взвесь засевают в расплавленную и остывшую до 50 °С питательную среду № 7 из расчета 30 млн микробных тел на 1 мл среды, т. е. 3 мл 1 млрд взвеси на 100 мл среды.

6.6. Выращивание спор Bac. cubtilis ATCC 6633.

Культуру высевают в пробирки со скошенным агаром / 2 % МПА, pH 6,5 ± 0,1/ и выращивают при 37 °С в течение 18—20 часов. Затем эту культуру со скошенного агара смывают 7 ± 2,0 мл стерильной дистиллированной воды и засевают матрацы с 2 % агаризированной средой, приготовленной на бульоне Хоттингера с содержанием 33 мг% аминного азота, pH 7,9 ± 0,1 /среда № 5/. Выращивают при 37 °С в течение 7 суток, а затем поступают также как при получении спор Bac. cereus ATCC 11778.

6.7. Приготовление взвеси спор Bac. cubtilis ATCC 6633.

В стандартную пробирку с 5 мл стерильной дистиллированной воды добавляют небольшое количество /0,1—0,2 мл/ споровой взвеси Bac. cubtilis ATCC 6633 и хорошо перемешивают. По стандарту мутности на 5 ед полученную взвесь доводят до концентрации 5 x 10^8 спор в 1 мл. Затем 1 мл данной взвеси вносят в 100 мл расплавленной и охлажденной до 60 °С ± 1 °С питательной среды.

6.8. Выращивание M. flavus ATCC 10240.

Культуру выращивают в пробирках со скошенным МПА с pH 6; 5 ± 0,1 / среда № 6 /. Используется суточная культура тест-микроба, выращенная на скошенном МПА pH 6,5 ± 0,1 при 37 °С в течение 19 ± 1,0 час. Выращенную культуру смывают физиологическим раствором, разводят до 1 млрд микробных тел по стандарту мутности на 10 ед. Готовую взвесь засевают в расплавленную и остывшую до 50 °С питательную среду из расчета 1 мл 1 млрд взвеси на 100 мл среды.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ /РАБОЧИХ/ КОНЦЕНТРАЦИЙ СТАНДАРТНЫХ АНТИБИОТИКОВ.

При определении остаточных количеств антибиотиков для приготовления контрольных концентраций используют стандарты антибиотиков т. е. очищенные образцы препарата, содержащие строго определенное количество единиц действия в 1 мг.

7.1. Приготовление рабочей концентрации хлортетрациклина /ХТЦ/.

Произвольную навеску хлортетрациклина /5—15 мг/ растворяют в 0,1 н соляной кислоте в соотношении 1 : 1 /1 мг антибиотика растворяют

в 1 мл кислоты/ и получают основной раствор. Далее по схеме № 1 на буфере № 2 готовят контрольное разведение антибиотика.

Пример: Стандарт ХТЦ содержитт 930 ед/мг. Навеску в 10 ± 0,0001 мг растворяют в 10 ± 0,0001 мл 0,1 н HCl. Основной раствор содержит 930 ед/мл. Из основного раствора готовят контрольное разведение, равное 0,05 ед/мл.

Схема № 1

№№ раствора	Соотношение растворов	Концентрация антибиотиков ед/мл
1	1 мл основного раствора + 8,3 буфера pH 5,2	100
2	1 мл раствора № 1 + 9 мл буфера pH 5,2	10
3	0,1 мл р-ра № 2 + 9,9 мл –"– –"–	0,1
4	5 мл раствора № 3 + 5 мл –"– –"–	0,05

Основной раствор хранится в холодильнике 30 суток.

7.2. Приготовление контрольной концентрации стрептомицина.

Навеску стандарта растворяют в фосфатном буфере pH 6,0 /№ 4/ в соотношении 1 : 1 /1 мг антибиотика растворяют в 1 мл буфера/. Этот раствор является основным и хранится в холодильнике до 30 дн. Из основного раствора на фосфатном буфере pH 7,9 ± 0,1 /буф. № 6/ готовят рабочую концентрацию стрептомицина, равную 2 ед/мл.

Основной раствор хранится в холодильнике 30 суток.

Схема № 2

№№ раствора	Соотношение растворов	Концентрация антибиотика, ед/мл
1	1 мл основного раствора + 9 мл буфера pH 7,8 ± 0,10	76
2	1 мл 1 раствора + 9 мл –"–	7,6
3	1 мл 2 раствора + 3,8 мл –"–	2,0

7.3. Приготовление контрольной концентрации пенициллина.

Навеску пенициллина растворяют в фосфатном буфере pH 6,0 /буф. № 4/ в соотношении 1 : 1, т. е. 1 мг антибиотика в 1 мл буфера. Этот раствор является основным и хранится в холодильнике 7 дней. Из него на том буфере готовят контрольную концентрацию пенициллина – 0,05 ед/мл.

Схема № 3

Примерная схема приготовления растворов пенициллина из стандартного активностью 1586 ед/мл

№№ раствора	Соотношение растворов	Концентрация антибиотика, ед/мл
1	0,6 мл стандартного раствора + 0,4 мл буфера pH 6,0	1000
2	0,1 мл раствора + 9,9 мл буфера pH 6,0	10
3	1 мл 2 раствора + 9 мл –"– –"–	1
4	1 мл 3 раствора + 9 мл –"– –"–	0,1
5	1 мл 4 раствора + 1 мл –"– –"–	0,05

7.4. Приготовление контрольной концентрации гризина.

Для приготовления основного раствора берут произвольную навеску стандарта гризина / 5—15 мг/ и растворяют её в 0,01 н HCl из, расчета 1 мг или 1000 ед/мг.

Основной раствор хранится в течение 30 дней. Дальнейшие разведения делают на буфере № 7 / pH 3,2/ по схеме № 4.

Схема № 4

№№ раствора	Соотношение растворов	Концентрация антибиотика, ед/мл
1	1 мл основного раствора + 9 мл буфера	100
2	1 мл раствора № 1 + 9 мл –"–	10
3	4 мл раствора № 2 + 6 мл –"–	4

7.5. Приготовление контрольной концентрации бацитрацина.

Для приготовления основного раствора стандарта бацитрацина берут произвольную навеску стандарта бацитрацина /10—20мг/ и растворяют её в фосфатном буфере pH 6,0 /буфер № 4/ до получения концентрации 100 ед/мл.

Основной раствор стандарта бацитрацина можно хранить в течение 30 дней. Из основного раствора готовят /рабочее/ контрольное разведение, равное 0,2 ед/мл по схеме № 5.

Схема № 5

№№ раствора	Соотношение растворов	Концентрация антибиотика, ед/мл
1	1 мл основного раствора + 9 мл буфера	10
2	2 мл раствора № 1 + 8 мл –"–	2
3	1 мл раствора № 2 + 9 мл –"–	0,2

8. ПОДГОТОВКА ЧАШЕК ПЕТРИ.

Колбы с агаром помещают в кипящую водяную баню. Для определения тетрациклинов используется среда № 3, стрептомицина – № 4, пенициллина № 7, гризина – № 8, цинкбацитрацина – № 6, Расплавленный агар охлаждают до определенной температуры и вносят в него необходимое количество взвеси тест-культуры: аспорогенные культуры /Sur. lutea, M. flavus/ засевают при температуре среды не выше 48 °С ± 2 °С, а споровые /Bac. cereus, Bac. cubtilis, Bac. mycoidis/ при 58° ± 2,0 °С. Среду перемешивают круговыми движениями и разливают в чашки Петри по 10,0 ± 0,1 мл, установленные строго на горизонтальном столе.

После застывания сред под дно чашек подкладывают трафарет /рис. 1/ и пробочным сверлом № 3 /9 мм/ вырезают 6 лунок, вырезанные блоки вынимают скальпелем.

9. ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ.

9.1. Исследование молока, молочных продуктов, яиц.

Пробы молока и жидких молочных, продуктов по 10,0 ± 0,1 мл, творога по 10,0 ± 0,1 г вносят в колбочки емкостью 50 мл и добавляют 10,0 ± 0,1 мл буферного раствора соответственно определяемому антибиотику, т. е. при определении тетрациклинов – буфер № 3; для стрептомицина – буфер № 6; пенициллина – буфер № 5 /см. раздел 5, Буферные растворы для экстрагирования антибиотиков/. Таким образом, получается разведение 1 : 2.

Яйца, предназначенные для исследования, предварительно прогревают на водяной бане при 65,0 ± 5,0 °С в течение 10 ± 0,1 мин. Яйца освобождают от скорлупы, затем отвешивают по 10,0 ± 0,1 г смешанного содержимого каждого яйца в колбочки и приливают 10,0 + 0,1 мл буфера соответственно определяемому антибиотику, т. е. при определении тетрациклинов – буфер № 3, стрептомицина – буфер № 6.

Подготовленные пробы помещают в термостат для экстракции антибиотиков на 90,0 ± 1 мин. при 37 °С ± 0,1 °С, периодически встряхивая содержимое колбочек, после чего смесь прогревают на водяной бане при температуре 60,0 ± 1,0 °С в течение 20,0 ± 0,1 мин.

Пробы переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 ± 100 об/мин в течение 10,0 ± 0,1 мин. Надосадочная жидкость является первым разведением /1 : 2/ и готова для внесения в лунки. Второе разведение /1 : 4/ готовят в химических пробирках – 1,0 ± 0,1 мл

надсадочной жидкости приливают к 1,0 ± 0,1 мл буфера соответственно определяемому антибиотику (без пепсина).

В подготовленные для исследований на соответствующий антибиотик чашки Петри, в три заранее отмеченные стеклографом лунки, вносят контрольное разведение стандарта, соответствующего определяемому антибиотику, по 0,05 ± 0,01 мл, а в три другие вносят такое же количество одного из разведений испытуемых растворов. Для каждого антибиотика на одну пробу необходимо 2—4 чашки Петри, т. е. на каждое разведение по 1—2 чашки.

После внесения в лунки экстрактов и стандарта антибиотика с определяемой концентрацией чашки помещают в термостат на 20 ± 2 часа при температуре 29 ± 1,0 °С /при определении тетрациклинов и пенициллина/ или при 37 ± 1,0 °С /при определении стрептомицина/.

На следующий день замеряют зоны задержки роста тест-культуры и производят расчет содержания антибиотиков в исследуемых продуктах /п.п. 10.1/.

9.2. Исследование мяса и мясных продуктов.

Навески по 10,0 ± 0,1 г. мышечной ткани, почки, печени, легкого и др. органов, вырезанные из средней части образца, измельчают режущим инструментом с последующим растиранием в ступке с кварцевым песком /предварительно простерилизованным/, приливая 20,0 ± 0,1 мл буфера соответственно определяемому антибиотику, т. е. при определении тетрациклинов – буфер № 3, цинкбацитрацина –№ 4, гризина-физиологический раствор /0,85 % NaCl/. При наличии микроразмельчителя тканей к измельченной ножницами пробе добавляют 20,0 ± 0,1 мл буфера, тщательно перемешивают, переносят в стакан от микроразмельчителя и гомогенизируют образец при максимальной скорости оборотов в течение 3 мин.

Экстракцию антибиотиков проводят в течение 1,5 ± 0,5 час.

При исследовании на гризин и цинкбацитрацин гомогенат прогревают на водяной бане при 65 ± 5 °С 30 мин для инактивации возможных ингибиторных веществ и лучшей десорбции антибиотика.

Центрифугируют пробы при 3000 об/мин в течение 20 ± 1 мин.

Затем поступают либо соответственно ходу определения, описанному в предыдущем п. 9.1 /когда надосадочную жидкость, являющуюся разведением 1 : 3, и приготовленное из неё разведение 1 : 6 вносят в лунки зараженной тест-микробом среде, далее по тексту п. 9.1, либо следующим образом:

Надосадочную жидкость в количестве 0,05 + 0,001 мл от каждого исследуемого образца вносят в 2—3 лунки на 2 параллельные чашки Петри. При определении гризина чашки ставят на 3 часа в холодильник при + 4 °С для преддиффузии.

Засеянные чашки с внесенной в лунки надосадочной жидкостью инкубируют в течение 18 ± 0,5 час. при 29 ± 1 °С /определение тетрациклинов/, либо при 37 ± 0,1 °С/ определение гризина и цинкбацитрацина/, после чего измеряют диаметры зон задержки роста тест-культуры и производят расчет активности остаточных количеств антибиотиков в исследуемых субстратах /п.п. 10.1, 10.2/.

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Измеряют зоны задержки роста тест-культур и производят расчет содержания антибиотиков в исследуемых продуктах либо по таблицам, составленным В. С. Дмитриевой и С. М. Семеновым /Дмитриева В. С., Семенов С. М. «Микробиологический контроль активности антибиотических препаратов», М., 1965 г./, /п. 10.1/ или по стандартным кривым /п. 10.2/.

10.1. Форма записи измерения зон задержки роста тест-микробов при расчете активности антибиотиков, содержащихся в виде остаточных количеств в пищевых продуктах, по таблицам Дмитриевой В. С.

/Примерный образец/

№ чашки	Диаметры зон задержки роста тест-микробов в мм			
	испытуемое разведение /1 : 3/	стандартное разведение 0,05 ед/мл /контроль/	испытуемое разведение /1 : 6/	стандартное разведение 0,05 ед/мл /контроль/
1	20	16,5	16	16
	20	16,5	16	16
	19,5	16,5	16,5	16
среднее	19,8	16,5	16,1	16
2	19	16	17,5	16,5
	19	16	17,0	16,5
	19,5	16	16,5	16,5
среднее	19,1	16	17	16,5

В среднее зон стандарта каждой чашки вносят поправку по постоянной зоне таблиц, которая равна 17 мм, что соответствует контрольной концентрации стандарта 0,05 ед/мл, а затем поправку вносят в величину зон испытуемого препарата.

Разведение	Зоны в мм	Поправки	Зоны после поправки	Среднее 2-х чашек
1 : 3	19,8	+ 0,5	20,3	20,2
	19,1	+ 1,0	20,1	
1 : 6	16,1	+ 1,0	17,1	
	17,0	+ 0,5	17,5	17,3

Определяют разность диаметров зон подавления роста при двух разведениях испытуемого препарата

20,2 – 17,3 = 2,9 мм

По таблице, соответствующей этой разности диаметров зон, находят значение активностей соответствующих диаметров зон подавления роста после поправки. В вертикальном столбце находят целые числа, в горизонтальном – десятые доли. Полученные значения умножают на соответствующие показатели разведения / 2 и 4; 3 и 6 /.

2,15 ед/мл х 3 = 6,45 ед/мл /зона 20,2/
1,08 ед/мл х 6 = 6,48 ед/мл /зона 17,3/
среднее 12,93 : 2 = 6,465 ед/мл

Пример расчета: Если контрольная концентрация больше иди меньше 1 ед/мл, то надо соответственно умножить или разделить на кратность этого числа 1 (К = 0,05 ед/мл, кратность = 20).

6,465 : 20 = 0,323, соответствует 6,465 х 0,05;

К = 2 ед/мл – 6,465 х 2 = 12,93 ед/мл.

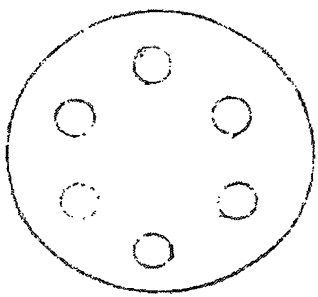


Рис. 1. Трафарет для вырезания лунок.

10.2. Построение стандартных кривых и расчет концентрации антибиотиков.

10.2.1. Построение стандартной кривой при определении концентрации хлортетрациклина.

Для построения стандартной кривой используются рабочие растворы с концентрациями: 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 ед/мл приготовленные по схеме № 6.

Схема № 6

№ р-ра	Содержание растворов	Концентрация в ед/мл
1	1 мл основного р-ра + 8,3 буфера pH 5,1 ± 0,1 /буфер № 2/	100
2	1 мл р-ра № 1 + 9 мл буфера pH 5,1 + 0,1 /буфер № 2/	10
3	2 мл р-ра № 2 + 5 мл –"–	4
4	1 мл р-ра № 3+ 9 мл –"–	0,4
5	5 мл р-ра № 4 + 5 мл –"–	0,2
6	5 мл р-ра № 5 + 5 мл –"–	0,1
7	5 мл р-ра № 6 + 5 мл –"–	0,05
8	5 мл р-ра № 7 + 5 мл –"–	0,025
9	2 мл р-ра № 7 + 8 мл –"–	0,01

В несколько проб / по 5 г/ измельченной мышечной ткани или субпродуктов, не обработанных антибиотиками, вносят раствор антибиотика с вышеперечисленными концентрациями в количестве 5 мл. Перемешивают и оставляют на 18 ± 1 час, при температуре + 4 °С. Затем центрифугируют при 3500 ± 500 об/мин в течение 25 мин. Надосадочная жидкость служит стандартом определенной концентрации антибиотика при построении кривой на полулогарифмической сетке /рис. 2/. Надосадочную жидкость соответственно 5—6 рабочим концентрациям стандартного антибиотика вносят в количестве 0,05 ± 0,001 мл в 2—3 лунки на 2 параллельных чашках Петри с засеянной тест-микробом средой. Инкубируют чашки, как указано в п. 9.2.

Рассчитывают среднеарифметическое значение диаметров зон задержки роста тест-микробов для каждой концентрации рабочего раствора стандарта из двух параллельных чашек и наносят их в виде точек на оси абсцисс. Из этих точек, а также из точек на оси ординат, соответствующих концентрациям рабочих растворов – 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 ед/мл проводят вертикальные и горизонтальные прямые. Линия,

соединяющая точки пересечения указанных прямых – стандартная кривая*). Стандартную кривую строят для каждой партии питательной среды.

10.2.2. Построение стандартной кривой для определения концентрации гризина.

Для построения стандартной кривой при определении гризина используются растворы с концентрациями: 1,6; 1,2; 0,8; 0,6; 0,4; 0,3; 0,2, после их контакта с мышечной тканью или субпродуктами. Указанные концентрации гризина делаются на физрастворе / 0,85 % NaCl / по схеме № 7.

Схема № 7

№ р-ра	Соотношение растворов	Концентрация в ед/мл
1	р-р 1 мл основного р-ра + 9 мл физ. р-ра	100
2	–"– 8 мл 1 р-ра + 2 мл физраствора	80
3	–"– 6 мл 1 р-ра + 4 мл –"–	60
4	–"–2 мл 2 р-ра + 8 мл –"–	16
5	–"– 1 мл 3 р-ра + 9 мл –"–	6,0
6	–"– 1 мл 4 р-ра + 9 мл –"–	1,6
7	–"– 1 мл 5 р-ра + 4 мл –"–	1,2
8	–"– 4 мл 7 р-ра + 2 мл –"–	0,8
9	–"– 6 мл 8 р-ра + 2 мл –"–	0,6
10	–"– 3 мл 8 р-ра + 3 мл –"–	0,4
11	–"– 3 мл 9 р-ра + 3 мл –"–	0,3
12	–"– 4 мл 11 р-ра + 2 мл –"–	0,2

*) – При отсутствии образцов мышечной ткани и субпродуктов, не обработанных антибиотиками, для построения стандартной кривой, можно пользоваться рабочими растворами стандартного хлортетрациклина, приготовленными на буфере № 2 (р-ры 5, 6, 7, 8, 9), непосредственно внося их в лунки на чашке Петри.

Далее поступают согласно методу, описанному в п. 10.2.1 настоящего раздела с учетом того, что на оси ординат откладывают значение концентраций контрольных растворов гризина, указанных выше.

10.2.3. Построение стандартной кривой при определении концентрации цинкбацитрацина

Для построения стандартной кривой при определении цинкбацитрацина из основного раствора по схеме № 8 с использованием буфера

№ 4 готовят рабочие растворы с концентрациями: 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,06; 0,03; 0,02 ед/мл.

Схема № 8

№ р-ра	Соотношение растворов	Концентрация, ед/мл
1 раствор	1 мл основного р-ра + 9 мл фосфатного буфера	10
2 раствор	1 мл 1 р-ра + 9 мл фосфатного буфера	1
3 –"–	4 мл 2 р-ра + 1 мл –"–	0,8
4 –"–	1 мл 3 р-ра + 1 мл –"–	0,4
5 –"–	1 мл 4 р-ра + 1 мл –"–	0,2
6 –"–	1 мл 5 р-ра + 1 мл –"–	0,1
7 –"–	6 мл 6 р-ра + 4 мл –"–	0,06
8 –"–	1 мл 7 р-ра + 1 мл –"–	0,03
9 –"–	2 мл 8 р-ра + 1 мл –"–	0,02

Приготовление рабочих концентраций антибиотика и построение стандартной кривой производят согласно метода, описанного в п.10.2.1 данного раздела с учетом того, что на оси ординат откладывают значения концентраций контрольных растворов цинкбацитрацина указанных выше.

10.2.4. Расчет активности по стандартной кривой.

Для экстракта /или его значения/ исследуемой пробы рассчитывают среднеарифметическое значение диаметров зон задержки роста тест-микроба двух параллельных чашек и наносят его в виде точки на оси абсцисс полулогарифмической сетки. Из этой точки восстанавливают перпендикуляр и проводят его до пересечения со стандартной кривой. Через точку пересечения перпендикуляра со стандартной, параллельно оси абсцисс проводят прямую до пересечения с осью ординат. Точка пересечения параллельной прямой с осью ординат указывает на активность антибиотика в экстракте исследуемой пробы – «С». Если исследовалось разведение экстракта, то полученный показатель его активности умножают на показатель разведения экстракта.

Расчет содержания остаточных количеств антибиотиков в 1 г исследованного продукта (в том случае, когда стандартная кривая, построена с использованием стандартных растворов, внесенных в гомогенаты мышечной ткани или субпродуктов) ведется по формуле:

$$X = C \times 1{,}5, \text{ где}$$

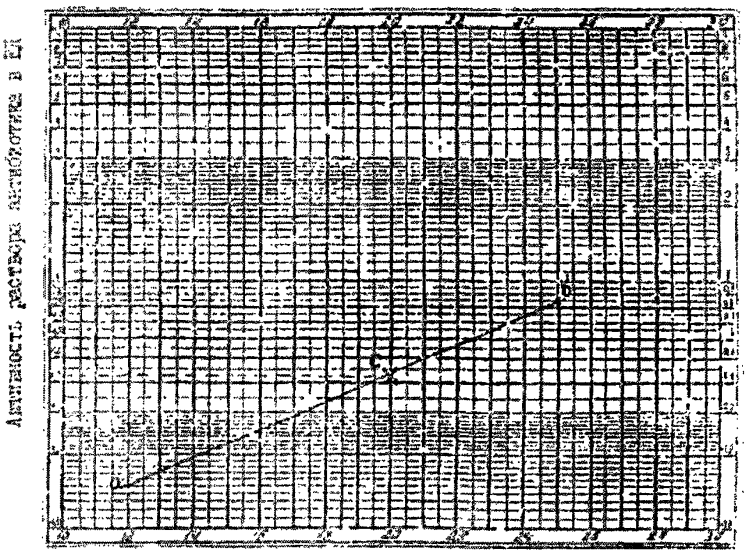
X – активность антибиотика в 1 г продукта,

C –активность антибиотика в 1 мл экстракта исследуемой пробы,

1,5 – степень разведения пробы буфером, отличная от разведения стандартного гомогената.

В случае, когда для построения стандартной кривой использовались чистые растворы стандартного антибиотика, расчет ведут по той же формуле, изменив лишь степень разведения пробы буфером на 3, а именно: X = C x 3. В данном случав в ответе указывают, что стандартная кривая построена с использованием чистых растворов антибиотиков.

Полулогарифмическая сетка для расчета,
активности растворов антибиотиков.



Диаметр зоны задержки роста в мм

Рис. 2

а–в – стандартная кривая для хлортетрациклина при добавлении антибиотика в ткань почек.

с – количество хлортетрациклина в ед/г ткани, содержащегося в исследуемом образце почек, при диаметре зоны угнетения роста тест-культуры, равном 20 мм.

Примерна форма представления результатов определения остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах (отдельно по видам антибиотиков)

Вид исследуемых продуктов	Общее число проб	Положительные результаты								
		кол-во проб	в % к общему кол-ву проб	в том числе в ед/мкг/г						
				0,01—0,05		0,051—0,1		0,11—1,0		1,1 и более	
Мясо											
Мясопродукты											
Молоко											
Творог											
Сметана											
Яйца											
Всего											

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Для каждой новой партии питательной среды необходимо проверять зоны контрольного разведения стандартного раствора антибиотика.

2. Для внесения в лунки берется то рабочее /контрольное/ разведение антибиотика, которое дает диаметр задержки роста тест-культуры, приблизительно 17 мм /16—18 мм/.

3. Для внесения в лунки испытуемых разведений одной пробы можно пользоваться одной пипеткой, при этом надо начинать с большего разведения /1 : 4 или 1 : 6 /.

4. Каждая партия стандарта пенициллина и стрептомицина отличается своей активностью и поэтому дается примерная схема приготовления рабочего разведения.

5. Стандарты антибиотиков и стандарты мутности можно выписать по следующим адресам:

а/ г. Москва, 121002,

Сивцев вражек, д. 41

Государственный Институт стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича;

б/ г. Москва,

Звенигородское шоссе, д. 5,

Гос. научно-контрольный институт ветпрепаратов.

gost.e-ecolog.ru