ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО

Методы определения наличия антибиотиков

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ГУ ВНИИВСГЭ), Институтом питания РАМН и Государственным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ГУ ВНИМИ)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 186 «Молоко и молочные продукты»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 26 апреля 2000 г. № 127-ст

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4 ИЗДАНИЕ (февраль 2010 г.) с Изменениями № 1, 2, утвержденными в феврале 2006 г., январе 2008 г. (ИУС 4—2006, 4—2008)

© ИПК Издательство стандартов, 2000
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО

Методы определения наличия антибиотиков

Milk.
Methods for determination of the antibiotics indication

Дата введения 2001—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на натуральное коровье молоко — сырье, пастеризованное, стерилизованное и предварительно восстановленное сухое молоко (далее — молоко) и устанавливает микробиологические и рецепторные методы определения наличия антибиотиков.

Раздел 1 **(Измененная редакция, Изм. № 1, 2).**

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 9225—84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 23454—79 Молоко. Методы определения ингибирующих веществ

ГОСТ 24065—80 Молоко. Методы определения соды

ГОСТ 24066—80 Молоко. Метод определения аммиака

ГОСТ 24067—80 Молоко. Метод определения перекиси водорода

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

3 Чашечный метод с Bac. stearothermophilus

3.1 Сущность метода

Метод основан на способности антибиотиков, содержащихся в молоке, диффундировать в агаровую среду со спорами тест-микроба и препятствовать его росту, что приводит к образованию прозрачных зон ингибиции. Наличие любого антибиотика в молоке устанавливают по диаметру зоны ингибиции.

3.2 Аппаратура, реактивы и материалы

3.2.1 Аппаратура, реактивы и материалы по ГОСТ 9225 и указанные в 3.2.2—3.2.16.

3.2.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

3.2.3 Центрифуга частотой вращения 3000 $мин^{-1}$ и разделяющим фактором 750 $м/с^2$.

Издание официальное

3.2.4 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

3.2.5 Колба коническая по ГОСТ 25336, вместимостью 250 $см^3$.

3.2.6 Линейка по ГОСТ 427, пределом измерения 150 мм или аппарат Микрофот 5ПО-1.

3.2.7 Пробойник диаметром 10 мм или сверло пробочное № 4.

3.2.8 Пипетка градуированная по ГОСТ 29227, 2-го класса точности, вместимостью 25 $см^3$.

3.2.9 Гидролизат кормовых дрожжей.

3.2.10 Диски со стрептомицином.

3.2.11 Оптический стандарт мутности ОСО 42-28-29—86.

3.2.12 Препарат СКИВ.

3.2.13 Стандарт стрептомицина РСО 9347-194-00494189—99.

3.2.14 Тест-микроб Bac. stearothermophilus ВКМВ-510, выпускаемый Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов РАН.

3.2.15 Фуксин основной, спиртовой раствор концентрации 50 $г/дм^3$.

3.2.16 Экстракт дрожжевой.

Допускается применять другие средства измерений с метрологическими характеристиками и оборудование с техническими характеристиками не хуже, а также реактивы по качеству не ниже указанных.

3.3 Отбор проб

3.3.1 Отбор проб — по ГОСТ 9225.

3.3.2 Пробы молока до испытания допускается хранить в холодильнике при температуре (5 ±1) °С не более 24 ч.

3.3.3 Анализу подлежат пробы молока, давшие положительный результат по ГОСТ 23454 и отрицательный — по ГОСТ 24065, ГОСТ 24066 и ГОСТ 24067.

3.4 Подготовка к анализу

3.4.1 Подготовка посуды и материалов

3.4.1.1 Всю новую посуду, предназначенную для микробиологических исследований, кипятят в подкисленной воде (раствор соляной кислоты объемной доли 1 %—2 %) в течение 15 мин, затем ополаскивают дистиллированной водой.

Вымытую посуду стерилизуют в сушильном шкафу при температуре (160±5) °С в течение 2 ч или в автоклаве при (121±2) °С в течение (30±1) мин с последующим подсушиванием.

Чашки Петри, пипетки и цилиндры стерилизуют завернутыми в бумагу или в металлических пеналах. В конец пипетки предварительно вкладывают кусочек ваты. Пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и обертывают бумагой. Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками.

3.4.2 Приготовление питательных сред

3.4.2.1 Для получения спор Bac. stearothermophilus ВКМВ-510 используют питательную среду следующего состава: дрожжевой экстракт — 10,0 г, пептон — 20,0 г, глюкоза — 0,5 г, дистиллированная вода — до 1000,0 $см^3$.

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают все компоненты питательной среды, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, доводят объем раствора водой до метки и устанавливают pH среды по pH-метру, равный (7,1±0,1). Разливают раствор в колбы по 200,0 $см^3$ и стерилизуют его при температуре (121±2) °С в течение (15±1) мин.

3.4.2.2 Для проведения анализа готовят агаровую среду следующего состава: гидролизат кормовых дрожжей — 1,0 г, пептон — 0,4 г, хлористый натрий — 0,1 г, агар — 1,6 г, дистиллированная вода — до 100,0 $см^3$.

В колбу вместимостью 200 $см^3$ вносят 100 $см^3$ дистиллированной воды и все компоненты среды, перемешивают до полного растворения и нагревают до кипения. Затем охлаждают до температуры (55±5) °С, устанавливают pH среды по pH-метру, равный (7,3±0,1), и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (15±1) мин.

3.4.2.3 Для проведения анализа допускается применять питательные среды указанного в 3.4.2.1 и 3.4.2.2 состава промышленного изготовления.

3.4.3 Получение спор тест-микроба

3.4.3.1 Среду по 3.4.2.1 засевают 2—3 $см^3$ 18—20-часовой тест-культуры Bac. stearothermophilus ВКМВ-510, выращенной в пробирках с этой же средой, тщательно перемешивают и помещают в термостат температурой (55±1) °С на 3 сут.

После окончания инкубации из посевов делают мазки, окрашивают их спиртовым раствором

основного фуксина 50 г/дм^3 и микроскопируют.

При наличии в поле зрения 90 %—95 % свободных сформировавшихся спор колбы с посевами помещают на 16—18 ч в холодильник для осаждения. Надосадочную жидкость из колбы сливают, а осадок разливают по стерильным центрифужным пробиркам и прогревают в водяной бане при температуре внутри пробирок (67±2) °С в течение (30±1) мин. Пробирки центрифугируют 20—30 мин. Осадок отмывают стерильной дистиллированной водой (не менее трех раз) до получения прозрачной жидкости над ним.

Взвесь спор вторично прогревают при температуре (67±2) °С в течение (30±1) мин. Полученную взвесь переносят в бактериологические пробирки и хранят в холодильнике не более 2 мес.

3.4.4 Приготовление засеянной агаровой среды

3.4.4.1 В пробирки отбирают взвесь спор тест-микроба по 3.4.3.1 и разводят стерильной дистиллированной водой до получения суспензии спор, визуально соответствующей 10 единицам по оптическому стандарту мутности.

3.4.4.2 К 100 см^3 расплавленной и охлажденной до (60±2) °С среды по 3.4.2.2 добавляют 2,5 см^3 водного раствора глюкозы массовой долей 40 % и 4 см^3 суспензии спор по 3.4.4.1. Смесь среды и спор тщательно перемешивают и разливают градуированной пипеткой по (11±1) см^3 в чашки Петри, установленные на строго горизонтальной поверхности стола.

3.4.4.3 Чашки засевают непосредственно перед употреблением.

В некоторых случаях чашки хранят в холодильнике при температуре (5±1) °С не более 2 сут. Перед использованием их прогревают в термостате при (55±1) °С в течение (20±1) мин.

3.4.5 Приготовление обезжиренного стерильного молока

3.4.5.1 Обезжиренное стерильное молоко получают из цельного молока кислотностью 16—18 °Т, предварительно проверенного на отсутствие ингибирующих веществ по ГОСТ 23454. В пробирки разливают обезжиренное молоко по 10 см^3 и стерилизуют при 10^5 Па (1 атм) в течение (10±1) мин.

Допускается использовать препарат СКИВ.

3.4.6 Приготовление контрольного разведения стрептомицина активностью 2,5 мкг/см^3 (Ед/г)

3.4.6.1 Контрольное разведение стрептомицина используют для проверки активности роста тест-микроба.

3.4.6.2 Контрольное разведение стрептомицина готовят в фосфатных буферных растворах.

Состав раствора 1: двузамещенный фосфорнокислый калий — 2,0 г, однозамещенный фосфорнокислый калий — 8,0 г, дистиллированная вода — до 1000,0 см^3.

В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 растворяют компоненты в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем водой до метки. Устанавливают pH раствора по pH-метру, равный (6,1±0,1), и стерилизуют при температуре (112±2) °С в течение (30±1) мин. Срок хранения раствора — не более 30 сут при температуре (5±1) °С.

Состав раствора 2: двузамещенный фосфорнокислый калий — 16,73 г, однозамещенный фосфорнокислый калий — 0,523 г, дистиллированная вода — до 1000,0 см^3.

В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 растворяют компоненты в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем водой до метки. Устанавливают pH раствора по pH-метру, равный (7,9±0,1), и стерилизуют при температуре (112±2) °С в течение (30±1) мин. Срок хранения раствора — не более 30 сут при температуре (5±1) °С.

3.4.6.3 Контрольное разведение готовят из основного раствора стрептомицина активностью 500 мкг/см^3, который получают растворением 5 мг стандарта антибиотика, взвешенного с отсчетом показания весов до 0,1 мг, в буферном растворе 1 по 3.4.6.2. Объем буферного раствора составляет 0,01 активности антибиотика.

Пример: При активности стандарта стрептомицина 760 мкг/мг навеску антибиотика (5 мг) растворяют в 7,6 см^3 буферного раствора 1 и получают основной раствор активностью 500 мкг/см^3.

Основной раствор антибиотика хранят в посуде из темного стекла с притертой пробкой не более 30 сут при температуре (5±1) °С.

Из основного раствора в трех пробирках готовят серию разведений антибиотика. В первую пробирку наливают 1 см^3 буферного раствора 2 по 3.4.6.2 и 1 см^3 основного раствора, во вторую — 9 см^3 буферного раствора 2 и 1 см^3 раствора из первой пробирки, в третью — 9 см^3 стерильного обезжиренного молока по 3.4.5 и 1 см^3 раствора из второй пробирки. Активность антибиотика в разведениях составляет соответственно 250; 25 и 2,5 мкг/см^3. Разведение антибиотика в молоке активностью 2,5 мкг/см^3 является контрольным.

Контрольное разведение стрептомицина используют в течение рабочего дня.

3.4.6.4 Взамен контрольного разведения стрептомицина для проверки активности роста тест-микроба могут быть использованы диски со стрептомицином по 3.2.10.

3.4.7 Подготовка проб молока к анализу

Каждую пробу молока наливают по 5—10 $см^3$ в чистую стерильную пробирку, прогревают в течение (10±1) мин на водяной бане при температуре внутри пробирки (87±2) °С и охлаждают в холодной воде до температуры 18 %—25 °С.

3.5 Проведение анализа

3.5.1 Непосредственно перед исследованием молока на поверхности агаровой среды, разлитой в чашки Петри по 3.4.4, пробойником или пробочным сверлом вырезают семь лунок диаметром 10 мм. Шесть лунок располагают по окружности чашки на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 28 мм их центров от центра чашки. Седьмую лунку вырезают в центре чашки (рисунок 1) только в случае использования контрольного разведения антибиотика.

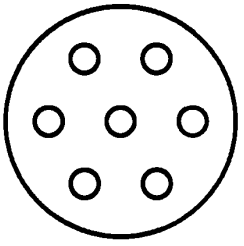

Рисунок 1 — Схема вырезания лунок в агаровой среде

3.5.2 В центральную лунку вносят 0,05 $см^3$ контрольного разведения антибиотика по 3.4.6.3 или в центре чашки на поверхность засеянной агаровой среды помещают диск со стрептомицином по 3.2.10. В лунки, расположенные по окружности чашки, вносят по 0,05 $см^3$ исследуемых проб молока по 3.4.7.

3.5.3 Чашки Петри выдерживают при комнатной температуре в течение (20±1) мин, затем их помещают в термостат крышками вверх и инкубируют при температуре (55±1) °С в течение 4 ч. Чашки в термостате размещают в один ряд.

3.6 Обработка результатов

3.6.1 Результаты анализа оценивают непосредственно после инкубирования. Чашки просматривают в проходящем свете от любого источника света.

Диаметры зон ингибиции роста тест-культуры, образуемых испытуемым образцом молока и контрольным разведением антибиотика, измеряют линейкой или на аппарате Микрофот 5ПО-1 по краям окружностей зон.

3.6.2 При отсутствии зон ингибиции контрольного разведения стрептомицина исследования повторяют с использованием вновь приготовленных засеянных чашек по 3.4.4 и контрольного разведения антибиотика по 3.4.6.

3.6.3 При отсутствии антибиотиков в молоке диаметр зоны ингибиции должен быть менее 12 мм, а при их наличии — 12 мм и более.

3.7 Метрологические характеристики

3.7.1 Наименьшие пределы определения антибиотиков представлены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г)[1)]	Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г)[1)]
Бензилпенициллин	0,005	Эритромицин	0,05
Стрептомицин	0,5—1,0	Неомицин	0,25
Тетрациклин	0,1	Мономицин	0,25
Окситетрациклин	0,1	Левомицетин	2,5
Хлортетрациклин	0,05	Олеандомицин	2,5

[1)] 1 мкг активного вещества равен 1 Ед активности.

4 Метод с индикатором бромкрезолпурпуром

4.1 Сущность метода

Метод основан на изменении окраски агаровой среды со спорами Bac. stearothermophilus var. calidolactis C953 от фиолетовой до желтой при отсутствии в исследуемом молоке антибиотиков и других ингибирующих веществ и сохранении окраски — при их наличии.

4.2 Аппаратура, материалы и реактивы

4.2.1 Термостат или блок термостатируемых ячеек, позволяющий поддерживать температуру от 30 °С до 70 °С с допускаемыми отклонениями ±0,5 °С от заданной.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

4.2.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

4.2.3 Ампулы «Delvotest® SP» герметично укупоренные, вместимостью 1,0 $см^3$ с агаровой средой, содержащей споры Bac. stearothermophilus var. calidolactis и индикатор бромкрезолпурпур, собранные в блоки.

4.2.4 Среда питательная таблетированная «Delvotest® SP», фасованная в бутылочки из темного стекла с навинчивающимся колпачком.

4.2.3, 4.2.4 **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

4.2.5 Шприц-дозатор автоматический вместимостью 1,0 $см^3$, настроенный на объем пробы 0,1 $см^3$.

4.2.6 Наконечники пластмассовые одноразовые, вместимостью 0,1 $см^3$.

4.2.7 Пинцет.

4.2.8 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

Допускается применять другие средства измерений с метрологическими характеристиками и оборудование с техническими характеристиками не хуже указанных.

4.2.9 Ампулы «Delvotest® SP-NT» или «Delvotest® SP MINI-NT», герметично укупоренные, вместимостью 1,0 $см^3$ с агаровой и питательной средой, содержащей споры Bac. stearothermophilus var. calidolactis и индикатор бромкрезолпурпур, собранные в блоки.

(Введен дополнительно, Изм. № 1).

4.2.10 Тестовый набор «Copan Test®» — комплект, включающий герметично укупоренные пробирки, собранные в блоки, и содержащие споры Bac. stearothermophilus var. calidolactis, помещенные в агар с питательными веществами и индикатором бромкрезолпурпуром; пипетки мерные вместимостью 0,1 $см^3$ одноразового использования и цветовую шкалу [3].

4.2.11 Пипетки вместимостью 0,1 $см^3$ для отбора образцов молока для исследования по ГОСТ 29169.

4.2.10, 4.2.11 **(Введены дополнительно, Изм. № 2).**

4.3 Отбор проб

4.3.1 Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 9225.

4.3.2 Допускается хранить пробы в холодильнике в течение 24 ч при температуре (6±2) °С.

4.4 Подготовка к анализу

4.4.1 Подготовка к анализу ампул по 4.2.3 и бутылочек по 4.2.4

Стеклянную бутылочку с питательными таблетками вынимают из холодильника и выдерживают в течение 20 мин при температуре от 15 до 25 °С.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.4.2 Осторожно, не повреждая упаковки, отрезают от блока необходимое число ампул или пробирок (с учетом контрольной пробы) и маркируют. Оставшиеся ампулы или пробирки хранят в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

4.4.3 Отвинчивают колпачок бутылочки и помещают его на стол вниз донышком. Пинцетом вынимают капсулу с силикагелем и поролоновый уплотнитель. Насыпают в колпачок необходимое количество таблеток питательной среды. Поролоновый уплотнитель и капсулу с силикагелем помещают в бутылочку.

4.4.4 Подготовка к анализу ампул или пробирок — по 4.2.9 или 4.2.10.

Осторожно, не повреждая упаковки, отрезают от блока необходимое число ампул или пробирок (с учетом контрольной пробы) и маркируют. Оставшиеся ампулы или пробирки хранят в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

4.5 Проведение анализа

4.5.1 Проведение анализа с использованием ампул «Delvotest® SP», «Delvotest® SP-NT» или «Delvotest® SP MINI-NT»

4.5.1.1 Соединительной частью шприца прокалывают укупорку ампул по 4.2.3 или 4.2.9.

4.5.1.2 В каждую открытую ампулу по 4.2.3 пинцетом помещают по одной таблетке питательной среды «Delvotest® SP», взятой из колпачка бутылочки по 4.4.3. Затем бутылочку плотно закрывают колпачком и хранят при температуре (20 ± 2) °С.

4.5.1.3 Шприцем-дозатором отбирают 0,1 $см^3$ анализируемого молока и вносят в каждую ампулу по 4.5.1.2 или 4.2.9. Для каждой пробы анализируемого молока используют новый наконечник. Оставшееся молоко сохраняют до конца анализа в холодильнике при температуре (6±2) °С.

4.5.1.4 Ампулы помещают в термостат и выдерживают при температуре (64,0±0,5) °С в течение 3 ч.

4.5.2 Проведение анализа с использованием тестового набора «Copan Test®»

4.5.2.1 Одноразовой мерной пипеткой отбирают 0,1 $см^3$ анализируемого молока и вносят в пробирку с приоткрытой фольгой по 4.2.10. Оставшееся молоко сохраняют до конца анализа в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С.

4.5.2.2 Пробирки с анализируемым молоком закрывают фольгой и помещают в блок термостатируемых ячеек и выдерживают при температуре (64,5 ± 0,5) °С в течение 3 ч.

4.5.2.3 Контрольное определение проводят в соответствии с 4.5.1, 4.5.2. В ампулу или пробирку вносят 0,1 $см^3$ предварительно восстановленного по ГОСТ 23454 препарата СКИВ.

4.5—4.5.2.3 **(Измененная редакция, Изм. № 2).**

4.6 Обработка результатов

4.6.1 Ампулы или пробирки извлекают из термостата или блока термостатируемых ячеек и определяют цвет содержимого.

4.6.2 Желтый цвет содержимого ампул или пробирок с контрольным и анализируемыми образцами молока свидетельствует об отсутствии в молоке ингибирующих веществ. Фиолетовое кольцо на поверхности содержимого ампулы (размером не более 1 мм) не учитывают.

4.6.3 Фиолетовый цвет содержимого ампул или пробирок с анализируемым образцом молока свидетельствует о наличии в молоке ингибирующих веществ.

4.6.1—4.6.3 **(Измененная редакция, Изм. № 2).**

4.6.4 Вывод о наличии в молоке антибиотиков делают после дополнительных исследований молока по ГОСТ 24065 — ГОСТ 24067 и при получении отрицательных результатов.

4.7 Метрологические характеристики

4.7.1 Наименьшие пределы определения антибиотиков представлены в таблице 2.

Таблица 2

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием		Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием	
	Copan Test® (CH-ATK)	Delvotest® SP-NT, Delvotest® SP MINI-NT		Copan Test® (CH-ATK)	Delvotest® SP-NT, Delvotest® SP MINI-NT
DH-Стрептомицин	<1,0	—	Оксациллин	0,005	0,010
Амоксициллин	0,002	0,003	Окситетрациклин	0,25	0,400
Ампициллин	<0,002	0,003	Пенициллин	0,001	—
Бензилпенициллин	—	0,0025	Спектиномицин	>0,3	—
Гентамицин	0,1	0,400	Спирамицин	>0,2	—
Дапсон	0,002	—	Стрептомицин	<1,0	—
Дигидрострептомицин	—	2,500	Сульфадиазин	0,05	—
Диклоксациллин	0,01	0,010	Сульфадиметоксин	0,05	—
Доксициклин	0,15	—	Сульфадоксин	0,1	—
Клоксациллин	0,01	0,020	Сульфаметазин	0,1	—
Левомицетин (хлорамфеникол)	—	7,500	Сульфаметоксазол	<0,05	—
			Сульфанометозин	<0,05	—
Линкомицин	—	0,300	Сульфатиозол	0,05	—
Нафциллин	0,005	0,010	Тетрациклин	0,25	0,300
Неомицин	0,5	0,400	Тиамфеникол	>0,1	—

Окончание таблицы 2

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием		Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием	
	Copan Test® (CH-ATK)	Delvotest® SP-NT, Delvotest® SP MINI-NT		Copan Test® (CH-ATK)	Delvotest® SP-NT, Delvotest® SP MINI-NT
Тилозин	0,05	0,100	Цефаперазон	0,025	0,060
Тилмикозин	0,75	—	Цефапирин	0,0025	0,005
Триметроприм	0,1	—	Цефацетрил	—	0,020
Хлорамфеникол	>5,0	—	Цефкуином	0,03	—
Хлортетрациклин	0,25	0,300	Цефтиофур	0,05	—
Цефазолин	0,05	—	Цефуроксим	0,06	—
Цефалексин	>0,045	0,060	Эритромицин	>0,2	0,250
Цефалониум	0,025	0,015			

(Измененная редакция, Изм. № 2).

5 Рецепторные методы

5.1 Рецепторный метод с 3,3,5,5-триметилбензидином и диметилсульфоксидом

5.1.1 Сущность метода

Метод основан на иммуноферментной реакции, в процессе которой антибиотики бета-лактамного типа захватываются специфическими белковыми рецепторами, меченными ферментом, содержащим индикатор, с образованием химически прочного окрашенного комплекса при взаимодействии с молоком, содержащим антибиотики.

Наличие или отсутствие пенициллина и антибиотиков бета-лактамного типа (ампициллина, цефапирина, амоксициллина, цефтиофура, клоксациллина, диклоксациллина, цефалониума, цефалексина, нафциллина, цефазолина, цефкуинома, цефацетрила, оксациллина, цефаперазона) устанавливают, сравнивая цвет зоны анализируемого молока с цветом контрольной зоны индикаторного устройства «Snap®».

5.1.2 Аппаратура, материалы и реактивы

5.1.2.1 Термостат, позволяющий поддерживать температуру (45 ± 5) °С.

5.1.2.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

5.1.2.3 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

5.1.2.4 Тест-набор Бета-лактам «Snap®», одноразовый комплект в герметичной упаковке, включающий пробирку «Snap®» с 3,3,5,5-триметилбензидином, укупоренную; пипетку мерную вместимостью 0,4 $см^3$; индикаторное устройство «Snap®» с диметилсульфоксидом по [1].

Тест-набор Бета-лактам «Snap®» хранят в холодильнике при температуре от 0 °С до 7 °С. Необходимое число комплектов для работы в течение суток допускается хранить при температуре (20 ± 2) °С.

5.1.3 Отбор проб

5.1.3.1 Отбор проб — по ГОСТ 9225. Пробы хранят в холодильнике в течение 24 ч при температуре (6 ± 2) °С.

5.1.4 Подготовка к анализу

5.1.4.1 Термостат нагревают до температуры (45 ± 5) °С и выдерживают при этой температуре не менее 5 мин.

5.1.4.2 Вскрывают упаковку тест-набора Бета-лактам «Snap®», проверяют положение шарика реактива в пробирке по 5.1.2.4. Шарик реактива при заполнении пробирки молоком должен находиться на ее дне. При необходимости шарик реактива устанавливают встряхиванием пробирки на ее дно.

5.1.5 Проведение анализа

5.1.5.1 Мерную пипетку по 5.1.2.4 наполняют анализируемым молоком до метки.

5.1.5.2 Анализируемое молоко из пипетки выливают в пробирку. Пробирку закрывают и тщательно перемешивают круговыми движениями до растворения реактива. Пробирку и индикаторное устройство помещают в термостат и выдерживают при температуре (45 ± 5) °С в течение 5—6 мин.

5.1.5.3 Вынимают подогретое индикаторное устройство из термостата и устанавливают на горизонтальной поверхности так, чтобы приемная воронка для заливки анализируемым молоком находилась слева от оператора.

5.1.5.4 Содержимое пробирки переливают в приемную воронку индикаторного устройства.

5.1.5.5 При появлении анализируемого молока в круглом окне клавиши индикаторного устройства клавишу нажимают до упора для изменения тока жидкости и промывки пористого материала раствором антибиотиков. Включение индикаторного устройства сопровождается характерным щелчком клавиши.

5.1.5.6 Индикаторное устройство повторно помещают в термостат, выдерживают при температуре (45 ± 5) °С в течение 4 мин и извлекают из термостата. Стабильность окраски сохраняется в течение 15 мин после извлечения устройства из термостата.

5.1.6 Обработка результатов

5.1.6.1 Сравнивают цвет контрольной зоны в индикаторном окне с цветом зоны анализируемого молока.

5.1.6.2 Контрольная зона должна быть синего цвета. Если изменение цвета контрольной зоны после проведения процедур по 5.5.4—5.5.6 не произошло, то определение повторяют с новым тест-набором Бета-лактам «Snap®».

5.1.6.3 Если цвет зоны анализируемого молока на индикаторном устройстве аналогичен или темнее цвета контрольной зоны — пенициллин или антибиотики бета-лактамного типа в анализируемом молоке отсутствуют.

Белый или менее интенсивный цвет зоны анализируемого молока по сравнению с цветом контрольной зоны свидетельствует о наличии в анализируемом молоке пенициллина или антибиотиков бета-лактамного типа.

5.1—5.1.6.3 **(Измененная редакция, Изм. № 1, 2).**

5.2 Рецепторный метод с коллоидным золотом

5.2.1 Сущность метода

5.2.1.1 Метод основан на проведении реакции комплексообразования антибиотиков бета-лактамного типа со специфическими белковыми рецепторами, меченными коллоидным золотом, и последующем визуальном выявлении оставшихся свободными меченых рецепторов путем хроматографии на полосках хроматографической бумаги, содержащих в виде соответствующих линий реакционную и контрольную зоны.

5.2.2 Аппаратура, материалы и реактивы

5.2.2.1 Термостат или блок термостатируемых ячеек, позволяющий поддерживать температуру (47,5 ± 0,5) °С.

5.2.2.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

5.2.2.3 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

5.2.2.4 Тест-набор «Beta Star®» [4], включающий флаконы со специфическими рецепторами, меченными коллоидным золотом; полоски хроматографической бумаги с зоной исследуемого молока и контрольной зоной; шприц-дозатор вместимостью 0,2 $см^3$ с наконечниками.

5.2.3 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 9225. Пробы хранят в холодильнике в течение 24 ч при температуре (6 ± 2) °С.

5.2.4 Подготовка к анализу

5.2.4.1 Термостат или блок термостатируемых ячеек нагревают до температуры (47,5 ± 0,5) °С и выдерживают при этой температуре не менее 5 мин.

5.2.4.2 Флакон встряхивают для осаждения содержимого в нем на дно.

5.2.5 Проведение анализа

5.2.5.1 Шприцем-дозатором с наконечником отбирают 0,2 $см^3$ анализируемого молока и переливают во флакон по 5.2.4.2. Флакон закрывают крышкой и встряхивают до полного растворения сухих веществ без образования пены.

5.2.5.2 Помещают флакон в термостат или блок термостатируемых ячеек по 5.2.2.1.

5.2.5.3 Не менее чем через 3 мин термостатирования во флакон, находящийся в термостате или в блоке термостатируемых ячеек, помещают входящую в комплект полоску хроматографической бумаги.

5.2.5.4 Хроматографирование проводят в течение 2 мин. Затем полоску хроматографической бумаги извлекают из флакона.

5.2.6 Обработка результатов

5.2.6.1 Сравнивают интенсивность цвета окрашенных в красный цвет зон, появляющихся после проведения процедуры по 5.2.5.4 в виде линий на полосках хроматографической бумаги.

5.2.6.2 Зона на верхней части полоски является контрольной. Если ее окрашивания не произошло после выполнения требований по 5.2.5.3, 5.2.5.4, то повторяют все процедуры в соответствии с 5.2.

5.2.6.3 Зона исследуемого молока расположена под контрольной зоной. Большая или равная интенсивность цвета контрольной зоны, а также отсутствие окраски зоны образца является признаком наличия антибиотиков бета-лактамного типа в молоке.

5.2.6.4 Меньшая интенсивность цвета контрольной зоны, по сравнению с интенсивностью цвета зоны под ней, является признаком отсутствия антибиотиков.

5.2.6.5 Контрольное определение проводят в соответствии с 5.1 и 5.2. В ампулу или пробирку вносят 0,1 $см^3$ предварительно восстановленного по ГОСТ 23454 препарата СКИВ.

5.2—5.2.6.5 **(Введены дополнительно, Изм. № 2).**

5.3 Метрологические характеристики

Наименьшие пределы определения антибиотиков бета-лактамного типа представлены в таблице 3.

Таблица 3

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием		Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием	
	Бета-лактам «Snap®»	Beta Star®		Бета-лактам «Snap®»	Beta Star®
Амоксициллин	0,007	0,002	Цефазолин	0,02	—
Ампициллин	0,005	0,002	Цефалексин	0,025	—
Диклоксациллин	0,02	0,005	Цефалониум	0,04	0,007
Клоксациллин	0,03	0,005	Цефаперазон	0,01	0,005
Нафциллин	0,07	0,008	Цефапирин	0,011	0,008
Оксациллин	0,04	0,005	Цефацетрил	0,05	—
Пенициллин	0,003*	—	Цефкуином	0,02	—
Пенициллин G	—	0,002	Цефтиофур	0,006	0,075

* 0,003 мкг активного вещества равно 0,005 Ед активности.

(Измененная редакция, Изм. 1, 2).

6 Требования безопасности

Работу со споровой культурой тест-микроба в лаборатории проводят в соответствии с санитарными правилами по [2].

Раздел 6 **(Введен дополнительно, Изм. № 1).**

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] Тест-набор Бета-лактам «Snap®». Россия, ООО «ЗИП-И Диагностикс».

[2] СП 1.2.731—99 Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности и гельминтами.

[3] Тестовый набор «Copan Test®» Дания, CHR HANSEN. Российское представительство: Россия, 105318 Москва, ул. Щербаковская, 53, корп. 17, 3 этаж, ООО «Хр. Хансен».

[4] Тест-набор «Beta Star®» Дания, CHR HANSEN. Российское представительство: Россия, 105318 Москва, ул. Щербаковская, 53, корп. 17, 3 этаж, ООО «Хр. Хансен».

ПРИЛОЖЕНИЕ А **(Измененная редакция, Изм. № 1, 2).**

УДК 637.11:543.06:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко, ингибирующие вещества, антибиотики, тест-микроб, зона ингибиции, антибиотики бета-лактамного типа, сульфаниламидные препараты

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Н.И. Гаврищук*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Подписано в печать 25.04.2010. Формат 60x84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,10. Тираж 110 экз. Зак. 45.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано в Калужской типографии стандартов
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru