

МОЛОКО

Методы определения наличия антибиотиков

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2010

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/с².

3.2.4 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

3.2.5 Колба коническая по ГОСТ 25336, вместимостью 250 см³.

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 см³.

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 *Vac. stearothermophilus* ВКМВ-510, выпускаемый Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов РАН.

3.2.15 Фуксин основной, спиртовой раствор концентрации 50 г/дм³.

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 $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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 $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч или в автоклаве при $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 *Vac. 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 см³.

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ помещают все компоненты питательной среды, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, доводят объем раствора водой до метки и устанавливают рН среды по рН-метру, равный $(7,1 \pm 0,1)$. Разливают раствор в колбы по 200,0 см³ и стерилизуют его при температуре $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 см³.

В колбу вместимостью 200 см³ вносят 100 см³ дистиллированной воды и все компоненты среды, перемешивают до полного растворения и нагревают до кипения. Затем охлаждают до температуры $(55 \pm 5)^\circ\text{C}$, устанавливают рН среды по рН-метру, равный $(7,3 \pm 0,1)$, и стерилизуют при температуре $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 см³ 18—20-часовой тест-культуры *Vac. stearothermophilus* ВКМВ-510, выращенной в пробирках с этой же средой, тщательно перемешивают и помещают в термостат температурой $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 3 сут.

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

основного фуксина 50 г/дм³ 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 $(67 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 $(67 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 см³ расплавленной и охлажденной до $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ среды по 3.4.2.2 добавляют 2,5 см³ водного раствора глюкозы массовой долей 40 % и 4 см³ суспензии спор по 3.4.4.1. Смесь среды и спор тщательно перемешивают и разливают градуированной пипеткой по (11 ± 1) см³ 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 $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ не более 2 сут. Перед использованием их прогревают в термостате при $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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 см³ 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/см³ (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 см³.

В мерной колбе вместимостью 1000 см³ растворяют компоненты в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем водой до метки. Устанавливают рН раствора по рН-метру, равный $(6,1 \pm 0,1)$, и стерилизуют при температуре $(112 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (30 ± 1) мин. Срок хранения раствора — не более 30 сут при температуре $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Состав раствора 2: двузамещенный фосфорнокислый калий — 16,73 г, однозамещенный фосфорнокислый калий — 0,523 г, дистиллированная вода — до 1000,0 см³.

В мерной колбе вместимостью 1000 см³ растворяют компоненты в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем водой до метки. Устанавливают рН раствора по рН-метру, равный $(7,9 \pm 0,1)$, и стерилизуют при температуре $(112 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (30 ± 1) мин. Срок хранения раствора — не более 30 сут при температуре $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$.

3.4.6.3 Контрольное разведение готовят из основного раствора стрептомицина активностью 500 мкг/см³, 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.

Примечание: При активности стандарта стрептомицина 760 мкг/мг навеску антибиотика (5 мг) растворяют в 7,6 см³ буферного раствора 1 и получают основной раствор активностью 500 мкг/см³.

Основной раствор антибиотика хранят в посуде из темного стекла с притертой пробкой не более 30 сут при температуре $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Из основного раствора в трех пробирках готовят серию разведений антибиотика. В первую пробирку наливают 1 см³ буферного раствора 2 по 3.4.6.2 и 1 см³ основного раствора, во вторую — 9 см³ буферного раствора 2 и 1 см³ раствора из первой пробирки, в третью — 9 см³ стерильного обезжиренного молока по 3.4.5 и 1 см³ раствора из второй пробирки. Активность антибиотика в разведениях составляет соответственно 250; 25 и 2,5 мкг/см³. Разведение антибиотика в молоке активностью 2,5 мкг/см³ 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 см³ 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

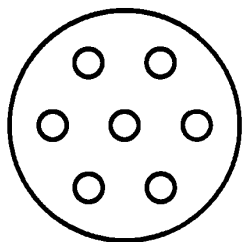


Рисунок 1 — Схема вырезания лунок в агаровой среде

28 мм их центров от центра чашки. Седьмую лунку вырезают в центре чашки (рисунок 1) только в случае использования контрольного разведения антибиотика.

3.5.2 В центральную лунку вносят 0,05 см³ 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 см³ 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.

Т а б л и ц а 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	Левомецетин	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 $\pm 0,5$ °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 см³ 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 см³, настроенный на объем пробы 0,1 см³.

4.2.6 Наконечники пластмассовые одноразовые, вместимостью 0,1 см³.

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 см³ 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 «Coran 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 см³ одноразового использования и цветовую шкалу [3].

4.2.11 Пипетки вместимостью 0,1 см³ 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

Стекланную 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 доньшком. 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 см³ 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 см³ 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 см³ предварительно восстановленного по ГОСТ 23454 препарата СКИБ.

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.

Т а б л и ц а 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
ДН-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	Сульфадiazин	0,05	—
Диклоксациллин	0,01	0,010	Сульфадиметоксин	0,05	—
Доксициклин	0,15	—	Сульфадоксин	0,1	—
Клоксациллин	0,01	0,020	Сульфаметазин	0,1	—
Левомецетин (хлор- амфеникол)	—	7,500	Сульфаметоксазол	<0,05	—
Линкомицин	—	0,300	Сульфанометозин	<0,05	—
Нафциллин	0,005	0,010	Сульфатиозол	0,05	—
Неомицин	0,5	0,400	Тетрациклин	0,25	0,300
			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	Цефалепразон	0,025	0,060
Тилмикозин	0,75	—	Цефепим	0,0025	0,005
Триметроприм	0,1	—	Цефазидим	—	0,020
Хлорамфеникол	>5,0	—	Цефтазидим	0,03	—
Хлортетрациклин	0,25	0,300	Цефтриаксон	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-лактамно-го 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-лактамно-го типа (ампициллина, цефалопина, амоксициллина, цефтриаксона, клексациллина, диклосациллина, цефалониума, цефалексина, нафциллина, цефазолина, цефтазидима, цефепима, цефтазидила, оксациллина, цефалепразона) 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 $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$.

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-лактама «Snap®», одноразовый комплект в герметичной упаковке, включающий пробирку «Snap®» с 3,3,5,5-триметилбензидином, укупоренную; пипетку мерную вместимостью 0,4 см³; индикаторное устройство «Snap®» с диметилсульфоксидом по [1].

Тест-набор Бета-лактама «Snap®» хранят в холодильнике при температуре от 0 °C до 7 °C. Необходимое число комплектов для работы в течение суток допускается хранить при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

5.1.3 Отбор проб

5.1.3.1 Отбор проб — по ГОСТ 9225. Пробы хранят в холодильнике в течение 24 ч при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$.

5.1.4 Подготовка к анализу

5.1.4.1 Термостат нагревают до температуры $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$ и выдерживают при этой температуре не менее 5 мин.

5.1.4.2 Вскрывают упаковку тест-набора Бета-лактама «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 $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$ 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 $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$ 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-лактама «Snap®».

5.1.6.3 Если цвет зоны анализируемого молока на индикаторном устройстве аналогичен или темнее цвета контрольной зоны — пенициллин или антибиотики бета-лактама 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-лактама типа.

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

5.2 Рецептный метод с коллоидным золотом

5.2.1 Сущность метода

5.2.1.1 Метод основан на проведении реакции комплексообразования антибиотиков бета-лактама типа со специфическими белковыми рецепторами, мечеными 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 $(47,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

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, мечеными коллоидным золотом; полоски хроматографической бумаги с зоной исследуемого молока и контрольной зоной; шприц-дозатор вместимостью $0,2\text{ см}^3$ с наконечниками.

5.2.3 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 9225. Пробы хранят в холодильнике в течение 24 ч при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$.

5.2.4 Подготовка к анализу

5.2.4.1 Термостат или блок термостатируемых ячеек нагревают до температуры $(47,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 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 $0,2\text{ см}^3$ 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-лактаминового 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 см³ 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-лактаминового типа представлены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием		Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г), с использованием	
	Бета-лактамы «Snap®»	Beta Star®		Бета-лактамы «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	Цефактрил	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 «Snar®». Россия, ООО «ЗИП-И Диагностикс».
[2] СП 1.2.731—99 Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности и гельминтами.
[3] Тестовый набор «Coran 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

H19

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. Гавришук*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Подписано в печать 25.04.2010. Формат 60х84¹/₈. 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.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Набрано в Калужской типографии стандартов
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.