

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

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

(ИУ ТНПА № 6-2012)

**Молоко и молочные продукты**  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСТАТКОВ**  
**Метод диффузии в пробирке**

**Малако і малочныя прадукты**  
**ВЫЗНАЧЭННЕ АНТЫБАКТЭРЫЯЛЬНЫХ АСТАТКАЎ**  
**Метад дыфузіі ў прабірцы**

(ISO/TS 26844:2006, IDT)

Издание официальное

БЗ 7-2009



Госстандарт  
Минск

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

## **Предисловие**

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

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

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

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

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

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

Перевод с английского языка (en).

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

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

Степень соответствия – идентичная (IDT).

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2010

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

Издан на русском языке

## Содержание

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

## ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Молоко и молочные продукты  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСТАТКОВ  
Метод диффузии в пробирке****Малако і малочныя прадукты  
ВЫЗНАЧЭННЕ АНТЫБАКТЭРЫЯЛЬНЫХ АСТАТКАЎ  
Метад дыфузіі ў прабірцы****Milk and milk products  
Determination of antimicrobial residues  
Tube diffusion test**

Дата введения 2010-01-01

**1 Область применения**

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

**2 Нормативные ссылки**

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

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

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

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

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

**3 Термины и определения**

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

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

*Пример – 95 %.*

**4 Принцип метода**

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

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

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

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

### 5.1 Тест-культура микроорганизмов

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

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

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

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

### 5.2 Питательная среда

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

#### 5.2.1 Основная среда

##### 5.2.1.1 Компоненты

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

Примечание – Основная обезвоженная среда имеет наименование Plate Count Agar.

##### 5.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде при нагревании и корректируют pH таким образом, чтобы после стерилизации его значение находилось в диапазоне  $7,0 \pm 0,2$ . Выдерживают среду в автоклаве при температуре  $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

Приготовленная таким образом основная среда может храниться не более 3 мес в темном месте при температуре от  $0 ^\circ\text{C}$  до  $5 ^\circ\text{C}$ .

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

## 5.2.2 Раствор бромкрезолового пурпурного

### 5.2.2.1 Компоненты

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

### 5.2.2.2 Приготовление

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

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

## 5.2.3 Раствор хлорамфеникола

### 5.2.3.1 Компоненты

Хлорамфеникол	20,0 мг
Метанол	5 мл
Вода	100 мл

### 5.2.3.2 Приготовление

Растворяют хлорамфеникол в метаноле и разбавляют водой до 100 мл.

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

## 5.2.4 Раствор триметоприма

### 5.2.4.1 Компоненты

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

### 5.2.4.2 Приготовление

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

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

## 5.2.5 Пробирка А (рН 7)

Расплавляют основную среду (5.2.1) и охлаждают ее в водяной бане (6.3) до температуры  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Добавляют 1,5 мл раствора хлорамфеникола (5.2.3) и 2 мл раствора бромкрезолового пурпурного (5.2.2) к 100 мл основной среды, предварительно нагретой на водяной бане при температуре  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , и хорошо перемешивают ее.

Доводят рН (6.5) среды, находящейся в водяной бане при температуре  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , до  $7,0 \pm 0,1$  при данной температуре, используя 1 моль/л NaOH или 1 моль/л HCl.

Затем добавляют на 100 мл среды приблизительно 2 мл суспензии тест-культуры микроорганизмов (5.1), чтобы в течение 4 ч 15 мин с отклонением  $\pm 30$  мин инкубации в водяной бане при температуре  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$  произошло изменение цвета среды, что говорит об отсутствии антибактериальных субстанций.

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

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

## 5.2.6 Пробирка В (рН 8)

Расплавляют основную среду (5.2.1) и охлаждают ее в водяной бане (6.3) до температуры  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Добавляют 0,6 мл раствора триметоприма (5.2.4) и 2 мл раствора бромкрезолового пурпурного (5.2.2) к 100 мл предварительно нагретой основной среды во время выдерживания ее в водяной бане при температуре  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и хорошо перемешивают.

Доводят рН (6.5) среды, находящейся в водяной бане при температуре  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , до  $8,00 \pm 0,02$  при данной температуре, используя 1 моль/л NaOH или 1 моль/л HCl. Следует проследить, чтобы во время этой процедуры значение рН не превысило 8,05.

Затем добавляют на 100 мл среды приблизительно 2 мл суспензии тест-культуры микроорганизмов (5.1), чтобы в течение 4 ч 15 мин с отклонением  $\pm 30$  мин инкубации в водяной бане при температуре  $(63 \pm 1)^\circ\text{C}$  произошло изменение цвета среды, что говорит об отсутствии антибактериальных субстанций.

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

Пробирка В с тест-культурой может храниться при температуре от  $0^\circ\text{C}$  до  $5^\circ\text{C}$  не более 3 дн, если пробирки закупорены во избежание испарения (например, парафином).

### 5.3 Стандартные растворы и контрольные пробы

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

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

#### 5.3.1 Стандартные растворы бензилпенициллина и контрольные пробы

Принимая во внимание ограниченную стабильность бензилпенициллина, рекомендуется все стандартные растворы бензилпенициллина готовить свежими и заморозить контрольные пробы молока в тот же день до температуры ниже минус  $18^\circ\text{C}$ .

##### 5.3.1.1 Основной (исходный) стандартный раствор бензилпенициллина

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

Основной (исходный) стандартный раствор бензилпенициллина может храниться максимум 2 дн при температуре от  $0^\circ\text{C}$  до  $5^\circ\text{C}$ .

##### 5.3.1.2 Рабочий стандартный раствор бензилпенициллина

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

##### 5.3.1.3 Контрольная проба молока с бензилпенициллином

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

Контрольная проба молока с бензилпенициллином может храниться не более 2 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус  $18^\circ\text{C}$ .

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

#### 5.3.2 Стандартные растворы окситетрациклина и контрольные пробы

##### 5.3.2.1 Основной стандартный раствор окситетрациклина

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

Стандартный раствор окситетрациклина может храниться не более 1 нед в темном месте при температуре от  $0^\circ\text{C}$  до  $5^\circ\text{C}$ .

##### 5.3.2.2 Рабочий стандартный раствор окситетрациклина

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

##### 5.3.2.3 Контрольная проба молока с окситетрациклином

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

Контрольная проба молока с окситетрациклином может храниться не более 3 мес в пробирках с тест-культурой (6.4) при температуре ниже минус  $18^\circ\text{C}$ .

#### 5.3.3 Стандартные растворы сульфадиазина и контрольные пробы

##### 5.3.3.1 Основной стандартный раствор сульфадиазина

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

Стандартный раствор сульфадиазина может храниться не более 2 нед в темном месте при температуре от  $0^\circ\text{C}$  до  $5^\circ\text{C}$ .



**5.3.3.2 Рабочий стандартный раствор сульфадиазина**

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

**5.3.3.3 Контрольная проба молока с сульфадиазином**

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

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

**5.3.4 Стандартные растворы неомицина и контрольные пробы****5.3.4.1 Основной стандартный раствор неомицина**

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

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

**5.3.4.2 Рабочий стандартный раствор неомицина**

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

**5.3.4.3 Контрольная проба молока с неомицином**

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

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

**5.3.5 Стандартные растворы эритромицина и контрольные пробы****5.3.5.1 Основной стандартный раствор эритромицина**

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

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

**5.3.5.2 Рабочий стандартный раствор эритромицина**

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

**5.3.5.3 Контрольная проба молока с эритромицином**

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

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

**5.4 Молоко, не содержащее антибактериальных остатков**

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

**6 Аппаратура и посуда**

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

Обычно применяется следующее микробиологическое лабораторное оборудование.

**6.1 Автоклав для влажной стерилизации.**

См. ISO 7218.

**6.2 Микропипетки вместимостью 1 000 мкл.**

**6.3 Водяная баня** с крышкой или закрытая, контролируемая термостатически, возможно с циркуляцией воды и поддержанием постоянной температуры  $(63 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(70 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$  соответственно.

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

**6.5 pH-метр** с точностью до  $\pm 0,01$  единиц pH, оборудованный автоматическим корректором температуры и подходящими электродами для измерений в жидкой среде при температуре  $(63 \pm 1)^\circ\text{C}$  (например, электрод Ag/AgCl).

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

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

## 7 Отбор проб

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

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

## 8 Приготовление испытуемой пробы

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

## 9 Методика

### 9.1 Контрольные пробы

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

- а) пробирка А (5.2.5), содержащая контрольную пробу молока с бензилпенициллином (5.3.1.3);
- б) пробирка А (5.2.5), содержащая контрольную пробу молока с окситетрациклином (5.3.2.3);
- с) пробирка А (5.2.5) с молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4);
- д) пробирка В (5.2.6), содержащая контрольную пробу молока с бензилпенициллином (5.3.1.3);
- е) пробирка В (5.2.6), содержащая контрольную пробу молока с сульфадиазином (5.3.3.3);
- ф) пробирка В (5.2.6) с молоком, не содержащим антибактериальных остатков (5.4);

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

### 9.2 Подготовка пробирок к испытаниям

**9.2.1** Отмеряют пипеткой 10 мл испытуемой пробы в стеклянную пробирку, нагревают на водяной бане (6.3) при  $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 10 мин, для того чтобы инактивировать термолabile натуральные ингибирующие вещества, и охлаждают быстро до комнатной температуры.

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

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

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

После диффузии молока можно поместить пробирки в водяную баню (6.3), нагретую до температуры  $70^\circ\text{C}$ , на 10 мин, для того чтобы активировать споры «тепловым ударом».

### 9.3 Инкубация

Помещают пробирку (9.2.4) в водяную баню (6.3) при температуре  $(63 \pm 1)^\circ\text{C}$  и инкубируют при данной температуре в течение 4 ч 15 мин с отклонением  $\pm 30$  мин, пока цвет в пробирке А или В с молоком, не содержащим антибактериальных остатков, не изменится от пурпурного к полностью желтому.

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

## 9.4 Представление результатов

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

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

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

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

## 10 Подтверждение анализа (не обязательно)

### 10.1 Общие указания

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

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

### 10.2 Предполагаемое подтверждение бета-лактамов

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

Можно отметить два типа энзимов бета-лактамазы:

- пенициллиназа (активность бета I), которая более активна в деградирующих пенициллинах;
- цефалоспориноаза (активность бета II), которая более активна в деградирующих цефалоспорины.

*Пример – Методика анализа молока с пенициллиназой. Добавляют 2 мл концентрата пеназы, содержащего 10 000 000 международных единиц пеназы/мл (имеется от Becton, Dickinson and Company<sup>2)</sup>), к 100 мл испытываемой питательной среды в пробирку А (5.2.5) до установления pH. Смешивают и распределяют испытываемую питательную среду в 1 мл порции в пробирке и оставляют питательную среду застывать. Затем выполняют методику анализа в соответствии с разделом 9.*

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

### 10.3 Предполагаемое подтверждение сульфонамидов

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

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

<sup>2)</sup> Примером продукта, имеющегося на рынке, является концентрат пеназы, выпускаемый фирмой Becton, Dickinson and Company. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой данного продукта.

#### **10.4 Подтверждение других ингибиторов**

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

#### **11 Обработка результатов**

Отмечают присутствие или отсутствие антимикробных веществ.

#### **12 Прецизионность**

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

#### **13 Протокол анализа**

Протокол анализа должен содержать:

- а) информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- б) используемый метод отбора проб;
- в) используемый метод определения со ссылкой на настоящий стандарт;
- г) все подробности выполнения методики, не описанные в настоящем стандарте, или выборочные наряду с любыми ошибками, которые могут оказать влияние на результат (ы) анализа;
- д) полученные результат (ы) анализа.

## Приложение А (справочное)

### Данные совместных исследований

Пределы обнаружения в микрограммах на килограмм молока для метода двух пробирок – пробирки А (рН7) и пробирки В (рН8) – были получены в результате нескольких совместных исследований [3] с участием трех квалифицированных лабораторий. Результаты приведены в таблицах А.1 – А.5.

**Таблица А.1 – Бета-лактамы**

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

**Таблица А.2 – Макролиды**

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

**Таблица А.3 – Аминогликозиды**

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

**Таблица А.4 – Тетрациклины**

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

**Таблица А.5 – Сульфонамиды**

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

## Приложение В (справочное)

### Приготовление суспензий тест-культуры микроорганизмов

#### В.1 Тест-культура микроорганизмов

Получают культуру *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 (идентифицирован к NIZO штамму C953), например от ATCC (<http://www.atcc.org/>)<sup>3)</sup> или из другого источника.

#### В.2 Исходная культура

##### В.2.1 Скошенный агар

###### В.2.1.1 Состав

Экстракт дрожжей	2 г
Пептон	5 г
Экстракт мяса	1 г
Хлорид натрия (NaCl)	5 г
Сульфат марганца (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	35 мг
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1 000 мл

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

###### В.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде при нагревании, доводя после стерилизации pH до значения  $7,4 \pm 0,1$  и выдерживают в автоклаве при температуре  $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

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

##### В.2.2 Хранение тест-культуры микроорганизмов

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

#### В.3 Получение спор тест-культуры микроорганизмов

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

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

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

**В.3.4** Выдерживают в инкубаторе при температуре  $(63 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 72 ч.

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

<sup>3)</sup> Данная информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта (см. также сноску 1).

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

**В.3.7** Суспендируют клетки в физиологическом пептонно-солевом растворе. Нагревают в течение 10 мин при температуре  $(80 \pm 1) ^\circ\text{C}$  для стимулирования создания спор.

#### **В.4 Доведение концентрации суспензии тест-культуры микроорганизмов**

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

#### **В.5 Хранение суспензии тест-культуры микроорганизмов**

Разливают небольшими порциями и хранят при температуре ниже минус  $20 ^\circ\text{C}$  не более 1 года.

**Библиография**

- [1] ISO 707 IDF 50 Milk and milk products – Guidance on sampling  
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)
- [2] NOUWS, J.F.M., LOEFFEN, G., SCHOUTEN, J., VAN EGMOND, H., KEUKENS, H. and  
STEGEMAN, H. Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of antibiotic resi-  
dues and sulphonamides in raw milk. Archiv fur Lebensmittelhygiene, 46, 1995, pp. 140-141
- [3] Instruction manual for the testing of herd bulk milk samples. Netherlands Milk Control Station (MCS  
Nederland), Zutphen, 2003 (in Dutch)
- [4] Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. IDF Bulletin, 258, 1991
- [5] Suhren, G. and Beukers, R. Delvotest S.P. for the detection of cloxacillin and sulfamethoxazole in  
milk. IDF interlaboratory study. J. AOAC Int. 81, 1998, pp. 978-990



Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

---

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

---

Издатель и полиграфическое исполнение:

Научно-производственное республиканское унитарное предприятие  
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

ЛИ № 02330/0552634 от 17.11.2009.

ул. Мелёжа, 3, комн. 406, 220113, Минск.