ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53774— 2010

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков

Издание официальное

БЗ 3—2010/92

Москва
Стандартинформ
2010

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности Россельхозакадемии (ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 февраля 2010 г. № 24-ст

4 ВЗАМЕН ГОСТ Р 51600—2000 в части разделов 5 и 6 (рецепторные методы)

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© 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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Оборудование, средства измерений, посуда, материалы и реактивы 2
4 Отбор проб 3
5 Методы контроля 3
5.1 Методы определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа 3
5.2 Методы определения наличия антибиотиков тетрациклиновой группы 5
5.3 Методы одновременного определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы 6
6 Метрологические характеристики 7
Приложение А (обязательное) Примеры возможных результатов определения наличия антибиотиков в анализируемом молоке и молочных продуктах 9
Библиография 11

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков

Milk and milk products.
Immunoenzyme methods for determination of antibiotics indication

Дата введения — 2011—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое, пастеризованное, стерилизованное и предварительно восстановленное сухое коровье молоко (далее — молоко) и устанавливает качественные иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков:

- методы определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа;
- методы определения наличия антибиотиков тетрациклиновой группы;
- методы одновременного определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 53430—2009 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

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

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

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

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Оборудование, средства измерений, посуда, материалы и реактивы

3.1 Термостат, позволяющий поддерживать температуру от 37 °С до 66 °С с допустимой погрешностью ± 0,5 °С.

3.2 Блок термостатированных ячеек, позволяющий поддерживать температуру (47,5 ± 1,0) °С.

3.3 Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от 0 °С до 12 °С по ГОСТ 16317.

3.4 Камера морозильная, позволяющая поддерживать температуру минус (20 ± 2) °С.

3.5 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

3.6 Термометр лабораторный стеклянный с диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

3.7 Пипетки вместимостью 0,5 и 1,0 см^3 по ГОСТ 29227.

3.8 Колбы мерные вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 1770.

3.9 Колбы конические вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336.

3.10 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.11 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

3.12 Тест-наборы для определения наличия антибиотиков:

- тест-набор № 1 (тест-набор Бета-лактам «Snap®»)[1)], включающий укупоренные пробирки с 3,3,5,5-триметилбензидином и специфическими рецепторами, позволяющими определять антибиотики бета-лактамного типа; пипетки мерные вместимостью 0,4 см^3; индикаторное устройство с диметилсульфоксидом;

- тест-набор № 2 (тест-набор «Beta Star®»)[1)], включающий флаконы, содержащие специфические рецепторы, меченные коллоидным золотом, позволяющие определять антибиотики бета-лактамного типа; полоски хроматографической бумаги с зоной анализируемого молока и контрольной зоной; шприцы-дозаторы вместимостью 0,2 см^3 с одноразовыми наконечниками;

- тест-набор № 3 (тест-набор «Delvo-X-PRESS®βL-II»)[1)], включающий пробирки с реагентом, флакон с индикатором, флакон с сухим контрольным раствором с антибиотиком (буферный раствор, после восстановления содержащий антибиотик с массовой концентрацией 0,003 мкг/г), ампулы с растворителем контрольного раствора (0,01 %-ный водный раствор тимерозала), промывочный раствор (буферный раствор, содержащий глицерин), проявитель (водный раствор ферментного субстрата);

- тест-набор № 4 (тест-набор Тетрациклин «Snap®»)[2)], включающий укупоренные пробирки с 3,3,5,5-триметилбензидином и специфическими рецепторами, позволяющими определять антибиотики тетрациклиновой группы; пипетки мерные вместимостью 0,4 см^3; индикаторное устройство с диметилсульфоксидом;

- тест-набор № 5 (тест-набор «TetraStar®»)[2)], включающий флаконы со специфическими рецепторами, меченными коллоидным золотом, позволяющими определять антибиотики тетрациклиновой группы; полоски хроматографической бумаги с зоной анализируемого молока и контрольной зоной; шприцы-дозаторы вместимостью 0,2 см^3 с одноразовыми наконечниками;

[1)] Тест-набор является рекомендуемым к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что настоящий стандарт устанавливает обязательное применение указанного тест-набора. Допускаются к использованию тест-наборы производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендуемые тест-наборы: Бета-лактам «Snap®» (ООО «ЗИП-И»), «Beta Star®» (ООО«Хр. Хансен»), «Delvo-X-PRESS®βL-II» (ООО «ДСМ Восточная Европа»).

[2)] Тест-набор является рекомендуемым к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанного тест-набора. Допускаются к использованию тест-наборы производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендуемые тест-наборы: Тетрациклин «Snap®» (ООО «ЗИП-И»), «TetraStar®» (ООО «Хр.Хансен»).

- тест-набор № 6 (тест-набор «Twinsensor^{BT}»)[1], включающий пластины микропробирок с буферным солевым раствором и специфическими рецепторами, позволяющими определять антибиотики бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы, индикаторные полоски хроматографической бумаги; шприц-дозатор вместимостью 0,2 см^3 с одноразовыми наконечниками; контрольные растворы: пробирки или флаконы со смесью сухого молока с массовой концентрацией пенициллина-G 0,004 мкг/г и окситетрациклина 0,1 мкг/г, красителя («Positive Standard»); пробирки или флаконы со смесью сухого молока без антибиотиков и красителя («Negative Standard»);

- тест-набор № 7 (тест-набор «Betastar® Combo»)[1], включающий флаконы со специфическими рецепторами, меченными коллоидным золотом, позволяющими определять антибиотики бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы; полоски хроматографической бумаги с зоной анализируемого молока и контрольной зоной; шприцы-дозаторы вместимостью 0,2 см^3 с одноразовыми наконечниками.

Применение конкретного оборудования, средств измерений, посуды, материалов и реактивов осуществляют в соответствии с требованиями разделов 4 и 5.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

4 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ Р 53430 с дополнением. Допускается хранить пробы молока для определения в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С не более 24 ч.

5 Методы контроля

5.1 Методы определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа

5.1.1 Метод с использованием тест-набора № 1

Метод основан на иммуноферментной реакции, в процессе которой антибиотики бета-лактамного типа захватываются специфическими белковыми рецепторами, меченными ферментом, содержащим индикатор, с образованием химически прочного комплекса, блокирующего свойство индикатора изменять цвет продуктов химических реакций.

Наличие антибиотиков бета-лактамного типа устанавливают, сравнивая цвет зоны анализируемого молока с цветом контрольной зоны индикаторного устройства.

5.1.1.1 Подготовка к определению

Вскрывают упаковку тест-набора № 1, проверяют положение шарика реактива в пробирке, который должен находиться на дне. При необходимости шарик реактива устанавливают на дно пробирки встряхиванием.

Срок хранения тест-набора № 1 (без упаковки) при температуре (20 ± 2) °С — не более 24 ч.

5.1.1.2 Проведение определения

Мерную пипетку вместимостью 0,4 см^3 по 3.12 наполняют анализируемым молоком до метки и переносят в пробирку с 3,3,5,5-триметилбензидином и специфическими рецепторами по 3.12. Пробирку закрывают и тщательно перемешивают круговыми движениями до растворения реактива.

Пробирку и индикаторное устройство по 3.12 помещают в термостат по 3.1 и выдерживают при температуре (45 ± 5) °С в течение 5—6 мин.

Индикаторное устройство вынимают из термостата и устанавливают на горизонтальной поверхности так, чтобы приемная воронка для заливания анализируемого молока находилась слева от оператора. Содержимое пробирки переливают в приемную воронку индикаторного устройства.

При появлении анализируемого молока в круглом окне клавиши индикаторного устройства клавишу нажимают до щелчка для изменения тока жидкости и промывания пористого материала раствором антибиотиков.

---

[1] Тест-набор является рекомендуемым к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанного тест-набора. Допускаются к использованию тест-наборы производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендуемые тест-наборы: «TwinsensorBT» (UNISENSOR SA), «Betastar® Combo» (ООО «Хр. Хансен»).

Индикаторное устройство выдерживают в термостате при температуре (45 ± 5) °С в течение 4 мин. Стабильность окраски сохраняется в течение 15 мин после извлечения индикаторного устройства из термостата.

5.1.1.3 Обработка результатов

Сравнивают цвет контрольной зоны в окне индикаторного устройства с цветом зоны анализируемого молока в соответствии с А.1 (приложение А).

Контрольная зона должна быть синего цвета.

Если изменение цвета контрольной зоны после проведения определения по 5.1.1.2 не произошло, то определение наличия антибиотиков в молоке повторяют с новым тест-набором № 1.

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

Если цвет зоны анализируемого молока на индикаторном устройстве белый или светлее цвета контрольной зоны, антибиотики бета-лактамного типа в анализируемом молоке присутствуют.

5.1.2 Метод с использованием тест-набора № 2

Метод основан на 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.

5.1.2.1 Подготовка к определению

Необходимое для проведения определения количество комплектов тест-наборов № 2 по 3.12 перед применением выдерживают при комнатной температуре в течение 10—15 мин.

Флаконы с реагентом по 3.12 встряхивают для полного осаждения содержимого на дне.

5.1.2.2 Проведение определения

Шприцем-дозатором с одноразовым наконечником по 3.12 отбирают 0,2 $см^3$ анализируемого молока и переливают во флакон. Флакон закрывают крышкой, встряхивают до полного растворения сухих веществ, затем открывают флакон и помещают его в блок термостатированных ячеек по 3.2 при температуре (47,5 ± 1,0) °С на 3 мин. Во флакон, находящийся в блоке термостатированных ячеек, помещают полоску хроматографической бумаги и термостатируют еще 2 мин. Затем полоску хроматографической бумаги извлекают из флакона.

5.1.2.3 Обработка результатов

Сравнивают интенсивность цвета окрашенных в красный цвет зон, появляющихся на полосках хроматографической бумаги в виде линий после проведения определения по 5.1.2.2 в соответствии с А.2 (приложение А).

Зона в верхней части полоски хроматографической бумаги является контрольной. Если после проведения определения не произошло окрашивания контрольной зоны, то определение наличия антибиотиков в молоке повторяют.

Зона определения антибиотиков бета-лактамного типа в анализируемом молоке на полоске хроматографической бумаги расположена под контрольной.

Большая интенсивность цвета зоны определения антибиотиков анализируемого молока по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны свидетельствует об отсутствии антибиотиков бета-лактамного типа в анализируемом молоке.

Меньшая или равная интенсивность цвета зоны определения антибиотиков анализируемого молока по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны, а также отсутствие ее окрашивания свидетельствуют о присутствии антибиотиков бета-лактамного типа в анализируемом молоке.

5.1.3 Метод с использованием тест-набора № 3

Метод основан на иммуноферментной реакции антибиотиков бета-лактамного типа со специфическими белковыми рецепторами, выделенными из бактерий вида Bacillus stearotermophillus, и пероксидазой хрена с образованием химически прочного комплекса.

Отсутствие или наличие антибиотиков бета-лактамного типа в анализируемом молоке устанавливают по изменению или отсутствию изменения цвета содержимого пробирки.

5.1.3.1 Подготовка к определению

Из тест-набора № 3 по 3.12 отбирают необходимое количество пробирок, которые перед определением маркируют и выдерживают при комнатной температуре.

Термостат по 3.1 нагревают до температуры (64 ± 2) °С и выдерживают при этой температуре не менее 15 мин.

а) Подготовка рабочего промывочного раствора

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 1770 пипеткой по ГОСТ 29227 вносят 1 см^3 промывочного раствора по 3.12 и доводят объем до метки дистиллированной водой по ГОСТ 6709.

б) Подготовка контрольного раствора

Флакон с сухим контрольным раствором и ампулу с растворителем по 3.12 вскрывают в соответствии с правилами работы с микробиологическими препаратами [1].

Во флакон с сухим контрольным раствором вносят содержимое ампулы, закрывают пробкой, перемешивают до растворения сухого вещества без образования пены и выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин.

Срок хранения контрольного раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 мес.

5.1.3.2 Проведение определения

В пробирки с реагентом по 3.12 пипеткой последовательно вносят 0,2 см^3 анализируемого молока и 0,2 см^3 индикатора. Параллельно в пробирку с реагентом без анализируемого молока пипеткой вносят 0,2 см^3 контрольного раствора с антибиотиком по 5.1.3.1 б) и 0,2 см^3 индикатора.

Все пробирки устанавливают в термостат и выдерживают при температуре (64 ± 2) °С в течение 3 мин при непрерывном встряхивании.

Пробирки извлекают из термостата и выливают содержимое в слив. Каждую пробирку трижды промывают рабочим промывочным раствором по 5.1.3.1 а), полностью наполняя пробирку раствором и полностью сливая его. После каждого слива пробирки устанавливают на фильтровальную бумагу по ГОСТ 12026 вверх дном.

Затем в каждую пробирку пипеткой добавляют по 1,0 см^3 проявителя по 3.12 и выдерживают при комнатной температуре в течение 3 мин.

5.1.3.3 Обработка результатов

Определяют цвет содержимого пробирок.

Синий цвет содержимого пробирок с анализируемым молоком свидетельствует об отсутствии антибиотиков бета-лактамного типа в нем.

Отсутствие изменения цвета содержимого пробирок с анализируемым молоком свидетельствует о присутствии антибиотиков бета-лактамного типа в нем.

Отсутствие изменения цвета содержимого пробирки с контрольным раствором с антибиотиком свидетельствует о достоверности полученных результатов.

5.2 Методы определения наличия антибиотиков тетрациклиновой группы

5.2.1 Метод с использованием тест-набора № 4

Метод основан на иммуноферментной реакции, в процессе которой антибиотики тетрациклиновой группы захватываются специфическими белковыми рецепторами, меченными ферментом, содержащим индикатор, с образованием химически прочного комплекса, блокирующего свойство индикатора изменять цвет продуктов химических реакций.

Наличие антибиотиков тетрациклиновой группы устанавливают, сравнивая цвет зоны анализируемого молока с цветом контрольной зоны индикаторного устройства.

5.2.1.1 Подготовка к определению

Подготовку тест-набора № 4 по 3.12 проводят по 5.1.1.1.

5.2.1.2 Проведение определения — по 5.1.1.2.

5.2.1.3 Обработка результатов

Сравнивают цвет контрольной зоны в окне индикаторного устройства с цветом зоны анализируемого молока в соответствии с А.1 (приложение А).

Контрольная зона должна быть синего цвета.

Если изменение цвета контрольной зоны после проведения определения по 5.1.1.2 не произошло, то определение наличия антибиотиков в молоке повторяют с новым тест-набором № 4.

Если цвет зоны анализируемого молока на индикаторном устройстве аналогичен или темнее цвета контрольной зоны, антибиотики тетрациклиновой группы в анализируемом молоке отсутствуют.

Белый или менее интенсивный цвет зоны анализируемого молока по сравнению с цветом контрольной зоны свидетельствует о присутствии в нем антибиотиков тетрациклиновой группы.

5.2.2 Метод с использованием тест-набора № 5

Метод основан на реакции комплексообразования антибиотиков тетрациклиновой группы со специфическими белковыми рецепторами, меченными коллоидным золотом, и последующем визу-

альном выявлении оставшихся свободными меченых рецепторов путем хроматографии на полосках хроматографической бумаги, содержащих в виде соответствующих линий реакционную и контрольную зоны.

5.2.2.1 Подготовка к определению

Подготовку тест-набора № 5 по 3.12 проводят по 5.1.2.1.

5.2.2.2 Проведение определения

Шприцем-дозатором с одноразовым наконечником по 3.12 отбирают 0,2 см^3 анализируемого молока и переливают во флакон. Флакон закрывают крышкой, встряхивают до полного растворения сухих веществ, затем открывают флакон и помещают его в блок термостатированных ячеек при температуре (47,5 ± 1,0) °С на 2 мин. Во флакон, находящийся в блоке термостатированных ячеек, помещают полоску хроматографической бумаги и термостатируют еще 3 мин. Затем полоску хроматографической бумаги извлекают из флакона.

5.2.2.3 Обработка результатов

Сравнивают интенсивность цвета окрашенных в красный цвет зон, появляющихся на полосках хроматографической бумаги в виде линий после проведения определения по 5.2.2.2 в соответствии с А.3 (приложение А).

Зона в верхней части полоски хроматографической бумаги является контрольной. Если после проведения определения не произошло окрашивания контрольной зоны, то определение наличия антибиотиков в молоке повторяют.

Зона определения антибиотиков тетрациклиновой группы в анализируемом молоке на полоске хроматографической бумаги расположена под контрольной.

Большая или равная интенсивность цвета зоны определения антибиотиков анализируемого молока по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны свидетельствует об отсутствии антибиотиков тетрациклиновой группы в анализируемом молоке.

Меньшая интенсивность цвета зоны определения антибиотиков анализируемого молока по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны, а также отсутствие ее окрашивания свидетельствуют о присутствии антибиотиков тетрациклиновой группы в анализируемом молоке.

5.3 Методы одновременного определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы

5.3.1 Метод с использованием тест-набора № 6

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

5.3.1.1 Подготовка к определению

Из тест-набора № 6 по 3.12 отбирают необходимое количество пеналов и перед их открытием выдерживают при комнатной температуре до видимого испарения влаги с поверхности.

Из тест-набора № 6 отбирают и маркируют необходимое количество микропробирок (не более 8) с учетом контрольных растворов.

Термост нагревают до температуры (40 ± 3) °С и выдерживают при этой температуре не менее 5 мин.

Восстановление контрольных растворов «Positive Standard» и «Negative Standard»

В пробирки с контрольными растворами пипеткой вносят по 1 см^3 дистиллированной воды (0,4 см^3 для контрольных растворов во флаконах) и тщательно перемешивают до образования однородного раствора.

Срок хранения восстановленных контрольных растворов в морозильной камере при температуре минус 20 °С — не более 6 мес. Не допускается повторное замораживание восстановленных контрольных растворов.

5.3.1.2 Проведение определения

Микропробирки по 3.12 помещают в термостат. В каждую микропробирку шприцем-дозатором с наконечником вносят 0,2 см^3 анализируемого молока, быстро перемешивают его с реагентом, наполняя и

сливая смесь шприцем-дозатором пять раз для получения однородного раствора, и выдерживают его в течение 3 мин.

В микропробирки помещают индикаторные полоски хроматографической бумаги и термостатируют в течение 3 мин при температуре (40 ± 3) °С. По истечении времени индикаторные полоски хроматографической бумаги извлекают.

Определение с использованием контрольных растворов проводят, как указано выше, при этом в одну микропробирку вносят 0,2 см^3 раствора «Positive Standard», в другую — 0,2 см^3 раствора «Negative Standard».

5.3.1.3 Обработка результатов

Сравнивают интенсивность цвета окрашенных в красный цвет зон, появляющихся на индикаторных полосках хроматографической бумаги в виде линий в соответствии с А.4 (приложение А).

Зона центральной части индикаторной полоски хроматографической бумаги является контрольной.

Если после проведения определения окрашивания контрольной зоны не произошло, то определение наличия антибиотиков в молоке повторяют по 5.3.1.2.

Зона определения антибиотиков тетрациклиновой группы в анализируемом молоке расположена над контрольной зоной. Зона определения антибиотиков бета-лактамного типа — под контрольной зоной.

Большая интенсивность цвета зон определения антибиотиков по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны свидетельствует об отсутствии антибиотиков в анализируемом молоке.

Меньшая или равная интенсивность цвета зоны определения антибиотиков по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны, а также отсутствие окрашивания зоны определения антибиотиков свидетельствуют о присутствии антибиотиков в анализируемом молоке.

При проведении определений с применением контрольных растворов «Positive Standard» и «Negative Standard» обработку результатов проводят, как указано выше.

5.3.2 Метод с использованием тест-набора № 7

Метод основан на реакции комплексообразования антибиотиков бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы 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 реакционные и контрольную зоны.

5.3.2.1 Подготовка к определению

Подготовку тест-набора № 7 по 3.12 проводят по 5.1.2.1.

5.3.2.2 Проведение определения — по 5.2.2.2.

5.3.2.3 Обработка результатов

Сравнивают интенсивность цвета окрашенных в красный цвет зон, появляющихся на полосках хроматографической бумаги в виде линий в соответствии с А.5 (приложение А).

Зона центральной части полоски хроматографической бумаги является контрольной.

Если после проведения определения по 5.2.2.2 не произошло окрашивания контрольной зоны, то определение наличия антибиотиков в молоке повторяют с новой тест-полоской.

Зона определения антибиотиков бета-лактамного типа в анализируемом молоке на полоске хроматографической бумаги расположена над контрольной зоной. Зона определения антибиотиков тетрациклиновой группы — под контрольной зоной.

Большая или равная интенсивность цвета зон определения антибиотиков испытуемого молока по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны свидетельствует об отсутствии антибиотиков в анализируемом молоке.

Меньшая интенсивность цвета зон определения антибиотиков по сравнению с интенсивностью цвета контрольной зоны, а также отсутствие окрашивания зон определения антибиотиков свидетельствуют о присутствии антибиотиков в анализируемом молоке.

6 Метрологические характеристики

Наименьшие пределы определения антибиотиков в молоке и молочных продуктах приведены в таблице 1.

Таблица 1

Ед/г (мкг/г)*

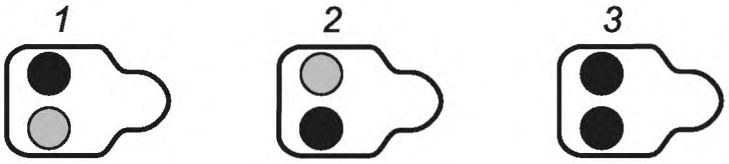
Наименование антибиотика	Наименьший предел определения антибиотиков с использованием тест-наборов						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
Амоксициллин	0,0035	0,002	0,004	—	—	0,003	0,002
Ампициллин	0,0035	0,002	0,004	—	—	0,003	0,002
Бензициллин	0,003	—	—	—	—	—	—
Гетациллин	0,01	—	0,006	—	—	—	—
Диклоксациллин	0,02	0,005	0,025	—	—	0,006	0,003
Доксициклин	—	—	—	0,04	—	0,0025	0,025
Клоксациллин	0,022	0,005	0,03	—	—	0,006	0,005
Метациклин	—	—	—	0,04	—	—	—
Метициллин	—	—	0,01	—	—	—	—
Нафциллин	0,052	0,008	—	—	—	0,030	0,012
Оксациллин	0,024	0,005	0,025	—	—	0,012	0,003
Окситетрациклин	—	—	—	0,01	0,06	0,009	0,05
Пенициллин G	0,002	0,002	0,002	—	—	0,002	0,002
Пенициллин V	0,003	—	0,003	—	—	—	—
Пиперациллин	0,006	—	0,005	—	—	—	—
Прокаин-пенициллин	0,002	—	0,003	—	—	—	—
Тетрациклин	—	—	—	0,011	0,06	0,015	0,05
Тикарциллин	0,04	—	0,03	—	—	—	—
Хлортетрациклин	—	—	—	0,026	0,04	0,006	0,025
Цефадроксил	0,03	—	0,005	—	—	—	—
Цефазолин	0,013	0,04	—	—	—	0,018	0,005
Цефалексин	0,025	—	0,025	—	—	0,750	—
Цефалон	—	—	—	—	—	0,003	—
Цефалоний	0,04	—	0,003	—	—	—	—
Цефалониум	0,04	0,007	—	—	—	0,003	0,004
Цефаперазон	0,01	0,005	0,005	—	—	0,003	0,005
Цефапирин	0,011	0,008	0,004	—	—	0,006	0,008
Цефацетрил	0,05	—	—	—	—	0,03	—
Цефкуином	0,02	0,02	—	—	—	0,02	0,02
Цефоксазол	0,05	—	0,075	—	—	—	—
Цефотаксим	0,01	—	0,004	—	—	—	—
Цефрадин	0,03	—	0,025	—	—	—	—
Цефтиофур	0,011	0,075	0,004	—	—	0,01	0,05
Цефуроксим	0,01	—	0,004	—	—	—	—

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

Приложение А
(обязательное)

Примеры возможных результатов определения наличия антибиотиков в анализируемом молоке и молочных продуктах

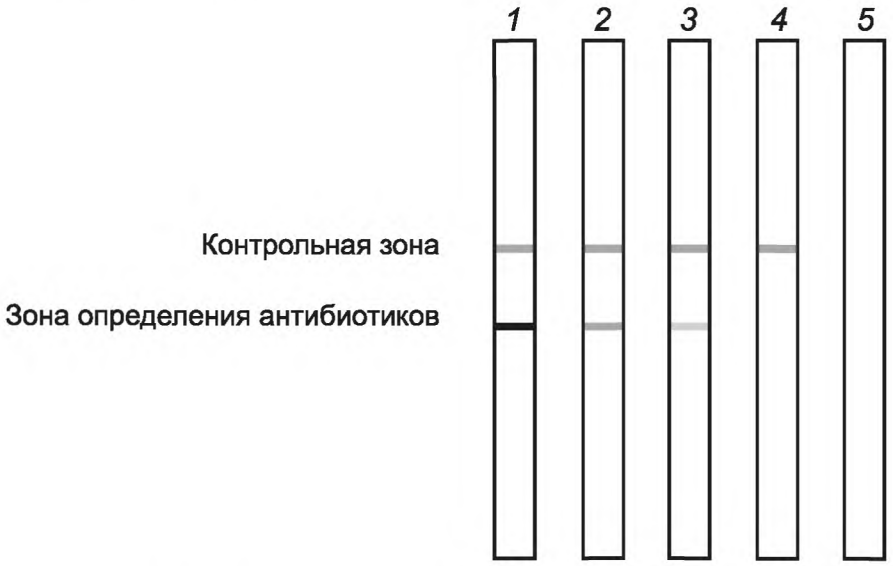
А.1 Примеры результатов определения наличия антибиотиков в анализируемом молоке и молочных продуктах с использованием тест-набора № 1 и тест-набора № 4 приведены на рисунке А.1.



1 — антибиотики присутствуют; *2*, *3* — антибиотики отсутствуют

Рисунок А.1

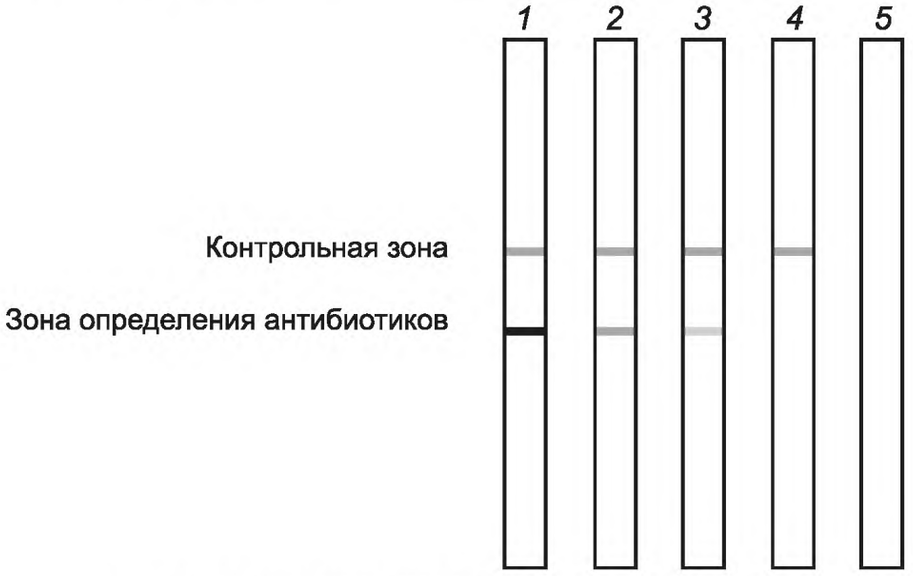
А.2 Примеры результатов определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа в анализируемом молоке и молочных продуктах с использованием тест-набора № 2 приведены на рисунке А.2.



1 — антибиотики отсутствуют; *2, 3, 4* — антибиотики присутствуют;
5 — недействительный результат

Рисунок А.2

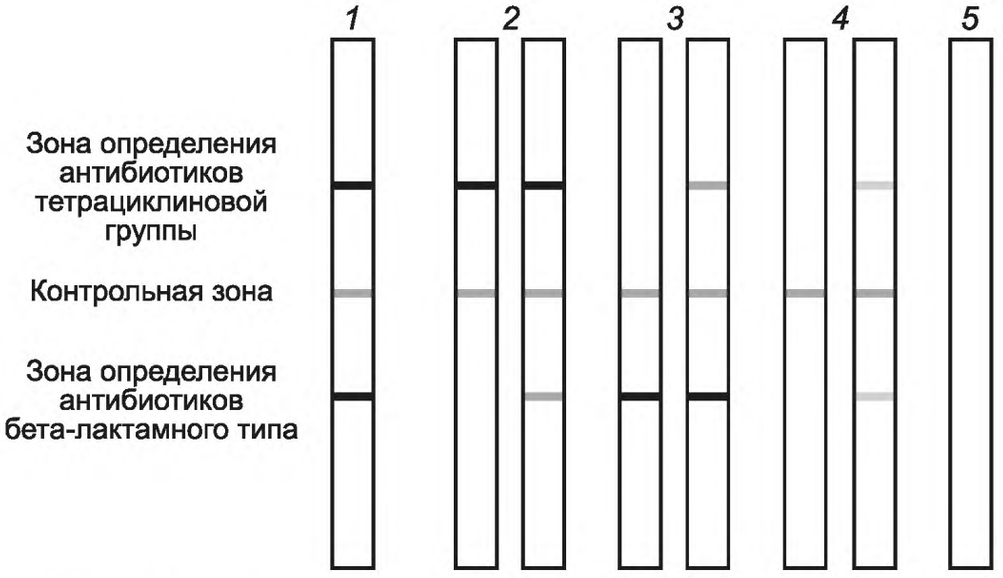
А.3 Примеры результатов определения наличия антибиотиков тетрациклиновой группы в анализируемом молоке и молочных продуктах с использованием тест-набора № 5 приведены на рисунке А.3.



1, 2 — антибиотики отсутствуют; *3, 4* — антибиотики присутствуют;
5 — недействительный результат

Рисунок А.3

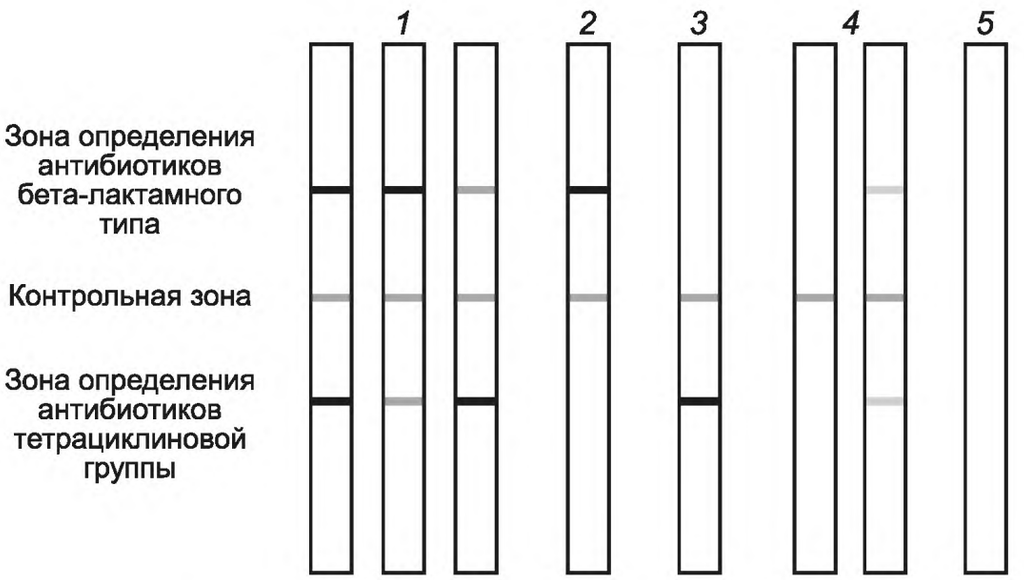
А.4 Примеры результатов определения наличия антибиотиков в анализируемом молоке и молочных продуктах с использованием тест-набора № 6 приведены на рисунке А.4.



1 — антибиотики отсутствуют; *2* — присутствуют антибиотики бета-лактамного типа; *3* — присутствуют антибиотики тетрациклиновой группы; *4* — присутствуют антибиотики бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы; *5* — недействительный результат

Рисунок А.4

А.5 Примеры результатов определения наличия антибиотиков в анализируемом молоке и молочных продуктах с использованием тест-набора № 7 приведены на рисунке А.5.



1 — антибиотики отсутствуют; *2* — присутствуют антибиотики тетрациклиновой группы; *3* — присутствуют антибиотики бета-лактамного типа; *4* — присутствуют антибиотики бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы; *5* — недействительный результат

Рисунок А.5

Библиография

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

УДК 637.11:543.06:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко и молочные продукты, иммуноферментные методы, методы определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа, методы определения наличия антибиотиков тетрациклиновой группы, методы одновременного определения наличия антибиотиков бета-лактамного типа и тетрациклиновой группы

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 26.05.2010. Подписано в печать 01.07.2010. Формат 60x84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 261 экз. Зак. 540.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6