

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО

Методы определения антибиотиков

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

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 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Сентябрь 2005 г.

© ИПК Издательство стандартов, 2000
© Стандартинформ 2005

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

II

МОЛОКО

Методы определения антибиотиков

Milk.
Methods for determination of the antibiotics

Дата введения 2001—07—01

1 Область применения

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия
- ГОСТ 2493—75 Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. 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. Методы определения аммиака
- ГОСТ 24067—80 Молоко. Метод определения перекиси водорода
- ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
- 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.

Издание официальное

1

3.2.12 Препарат СКИВ.

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

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

3.2.15 Фуксин основной, спиртовой раствор концентрации 50 г/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 Анализ 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 *Bac. stearothermophilus* ВКМВ-510 используют питательную среду следующего состава: дрожжевой экстракт — 10,0 г, пептон — 20,0 г, глюкоза — 0,5 г, дистиллированная вода — до 1000,0 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 *Bac. 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 $(11 \pm 1) \text{ см}^3$ в чашки Петри, установленные на строго горизонтальной поверхности стола.

3.4.4.3 Чашки засевают непосредственно перед употреблением.

В некоторых случаях чашки хранят в холодильнике при температуре $(5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ не более 2 сут. Перед использованием их прогревают в термостате при $(55 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение $(20 \pm 1) \text{ мин}$.

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 10⁵ Па (1 атм) в течение $(10 \pm 1) \text{ мин}$.

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 $(30 \pm 1) \text{ мин}$. 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 $(30 \pm 1) \text{ мин}$. 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.

Пример: 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 $(10 \pm 1) \text{ мин}$ на водяной бане при температуре внутри пробирки $(87 \pm 2) ^\circ\text{C}$ 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

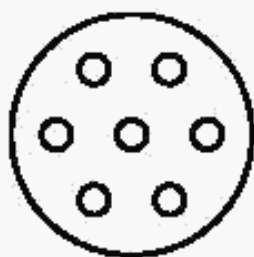


Рисунок 1 — Схема вырезания лунок в агаровой среде

10 мм. Шесть лунок располагают по окружности чашки на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 28 мм их центров от центра чашки. Седьмую лунку вырезают в центре чашки (рисунок 1) только в случае использования контрольного разведения антибиотика.

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

3.5.3 Чашки Петри выдерживают при комнатной температуре в течение (20 ± 1) мин, затем их помещают в термостат крышками вверх и инкубируют при температуре $(55 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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 СПО-1 по краям окружностей зон.

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

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

3.7 Метрологические характеристики

3.7.1 Наименьшие пределы определения антибиотиков представлены в таблице 1.

Таблица 1

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

¹⁾ 1 мкг активного вещества равен 1 Ед активности.

4 Метод с индикатором бромкрезолпурпуром

4.1 Сущность метода

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

4.2 Аппаратура, материалы и реактивы

4.2.1 Термостат, позволяющий поддерживать температуру от 30 до 70 °С с допускаемыми отклонениями $\pm 0,5 ^\circ\text{C}$ от заданной.

4.2.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16217.

4.2.3 Среда агаровая «Delvotest®» со спорами *Bac. stearothermophilus* и индикатором бромкрезолпурпуром, фасованная в герметично закупоренные ампулы вместимостью $1,0 \text{ см}^3$, собранные в блоки.

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

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

4.2.6 Наконечники пластмассовые одноразовые, вместимостью $0,1 \text{ см}^3$.

4.2.7 Пинцет.

4.2.8 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

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

4.3 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 $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

4.4 Подготовка к анализу

4.4.1 Стеклообразную бутылочку с питательными таблетками вынимают из холодильника и выдерживают в течение 20 мин при температуре от 15 до 25 $^\circ\text{C}$.

4.4.2 Осторожно, не повреждая упаковки, отрезают от блока необходимое количество ампул (с учетом контрольной пробы) и маркируют. Оставшиеся ампулы хранят в холодильнике.

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.

4.5 Проведение анализа

4.5.1 Соединительной частью шприца прокалывают укупорку ампул.

4.5.2 В каждую ампулу пинцетом помещают по одной таблетке питательной среды «Delvotest®». Бутылочку со средой плотно закрывают колпачком и сохраняют в дальнейшем при комнатной температуре.

4.5.3 Шприцем отбирают 0,1 см³ пробы молока и вносят в ампулу. Для каждой пробы молока используют новый наконечник. Оставшееся молоко сохраняют до конца анализа в холодильнике при температуре $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

4.5.4 Ампулы «Delvotest®» помещают в термостат и выдерживают при температуре $(64,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение 3 ч.

4.5.5 Контрольное определение проводят в соответствии с 4.5.1; 4.5.2 и 4.5.4. В ампулу вносят 0,1 см³ предварительно восстановленного по ГОСТ 23454 препарата СКИВ.

4.6 Обработка результатов

4.6.1 Ампулы извлекают из термостата и определяют цвет содержимого.

4.6.2 Желтый цвет содержимого ампул 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 с анализируемым образцом молока свидетельствует о наличии в молоке ингибирующих веществ.

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

4.7 Метрологические характеристики

4.7.1 Наименьшие пределы определения антибиотиков представлены в таблице 2.

Таблица 2

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г)	Наименование антибиотика	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г)
Бензилпенициллин	0,0025	Тетрациклин	0,300
Клоксациллин	0,020	Окситетрациклин	0,400
Диклоксациллин	0,010	Хлортетрациклин	0,300
Оксациллин	0,010	Тилозин	0,100
Нафциллин	0,010	Эритромицин	0,250
Ампициллин	0,003	Линкомицин	0,300
Амоксициллин	0,003	Гентамицин	0,400
Цефалпирин	0,005	Неомицин	0,400
Цефалониум	0,015	Дигидрострептомицин	2,500
Цефалексин	0,060	Левомецетин /хлорамфеникол/	7,500
Цефазетрил	0,020		
Цефоперазон	0,060		

5 Требования безопасности

Работу со споровой культурой тест-микроба в лаборатории проводят в соответствии с санитарными правилами по [1].

ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

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, ингибирующие вещества, антибиотики, тест-микроб, зона ингибиции

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.Е. Пестерова*
Компьютерная перетка *В.И. Грищенко*

Подписано в печать 29.09.2005. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,75. Тираж 60 экз. Зак. 745. С 1962.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано в ИПК Издательство стандартов на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Дялиный пер., 6.

Изменение № 1 ГОСТ Р 51600—2000 Молоко. Методы определения антибиотиков

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 09.02.2006 № 6-ст

Дата введения 2007—07—01

Наименование стандарта изложить в новой редакции:

«Молоко. Методы определения наличия антибиотиков

Milk. Methods for determination of the antibiotics indication».

Раздел 1 изложить в новой редакции:

«1 Область применения

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

Подпункт 4.2.3 изложить в новой редакции:

«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».

Подпункт 4.2.4. Заменить слово: «Delvotest[®]» на «Delvotest[®] SP».

Раздел 4 дополнить подпунктом — 4.2.9:

«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».

Подпункт 4.4.1 дополнить наименованием (после обозначения): «Подготовка к анализу ампул по 4.2.3 и бутылочек по 4.2.4».

Подпункт 4.4.2 дополнить словами: «при температуре (6 ± 2) °С».

Пункт 4.4 дополнить подпунктом — 4.4.4:

«4.4.4 Подготовка к анализу ампул по 4.2.9

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

(Продолжение см. с. 22)

Подпункт 4.5.1 дополнить словами: «по 4.2.3 или 4.2.9».

Подпункты 4.5.2, 4.5.3 изложить в новой редакции:

«4.5.2 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.

4.5.3 Шприцем-дозатором отбирают 0,1 см³ анализируемого молока и вносят в каждую ампулу по 4.5.2 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.

Подпункт 4.5.4. Исключить слово: «Delvotest[®]».

Раздел 5 изложить в новой редакции:

«5 Метод с 3,3,5,5-триметилбензидином и диметилсульфоксидом»

5.1 Сущность метода

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

Наличие или отсутствие пенициллина и антибиотиков бета-лактаминового типа (ампициллина, цефепима, амоксициллина, цефтиофура, флоксациллина, диклоксациллина, цефалониума, цефалексина, нафциллина, цефазолина, цефтриаксона, цефтазидима, оксациллина, цефоперазона) устанавливают, сравнивая цвет зоны анализируемого молока с цветом контрольной зоны индикаторного устройства «Snap[®]».

5.2 Аппаратура, материалы и реактивы

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

5.2.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

5.2.3 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

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

5.3 Отбор проб

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

(Продолжение см. с. 23)

5.4 Подготовка к анализу

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

5.4.2 Вскрывают упаковку тест-набора Бета-лактам «Spar®», проверяют положение шарика реактива в пробирке по 5.2.4. Шарик реактива при заполнении пробирки молоком должен находиться на ее дне. При необходимости шарик реактива устанавливают встряхиванием пробирки на ее дно.

5.5 Проведение анализа

5.5.1 Мерную пипетку по 5.2.4 наполняют анализируемым молоком до метки.

5.5.2 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.

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

5.5.4 Содержимое пробирки переливают в приемную воронку индикаторного устройства.

5.5.5 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.

5.5.6 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.

5.6 Обработка результатов

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

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

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

(Продолжение см. с. 24)

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

5.7 Метрологические характеристики

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

Т а б л и ц а 3

Наименование антибиотиков	Наименьший предел определения, Ед/г (мкг/г)
Пенициллин ^{*)}	0,003
Ампициллин	0,005
Цефепим	0,011
Амоксициллин	0,007
Цефтиофур	0,006
Клоксациллин	0,030
Диклоксациллин	0,020
Цефалониум	0,040
Цефалексин	0,025
Нафциллин	0,070
Цефазолин	0,020
Цефкуиним	0,020
Цефтазидим	0,050
Оксациллин	0,040
Цефоперазон	0,010

^{*)} 0,003 мкг активного вещества равно 0,005 Ед активности.

Стандарт дополнить разделом — 6:

«6 Требования безопасности

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

Приложение А. Библиографию изложить в новой редакции:

«Библиография

[1] Тест-набор Бета-лактама «Snap[®]», Россия, ООО «ЗИП-И Диагностика»

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

Ключевые слова после слов «зона ингибиции» дополнить словами: «антибиотики бета-лактаманного типа».

(ИУС № 4 2006 г.)