НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ. Качественный метод

Дата введения - _____

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо и продукты убоя животных и устанавливает микробиологические методы качественного определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.

2 Нормативные ссылки

ГОСТ Р ИСО 7218-2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

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

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

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

ГОСТ Р ИСО 6887-2 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила подготовки мяса и мясных продуктов

П р и м е ч а н и е 1 – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому ежегодному 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 документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Анализ выполняется методом диффузии в агар. Присутствующие в продукте антибиотики и антимикробные химиотерапевтические вещества вызывают образование зон подавления роста вокруг исследуемого образца или лунки.

4 Питательные среды и реактивы

4.1. Агаризованная питательная среды по Кундрату, состав

Пептон	17,0 г;
Натрий хлористый	3,0 г;
Глюкоза	3,0 г;
Сахароза	2,0 г;
Крахмал	3,0 г;
Желатин	2,5 г;
Бромкрезоловый пурпурный	0,016 г;
Агар-агар	10,0 г;
Дистиллированная вода	До 1000 мл
pH готовой среды	6,8±0,2

4.2. Агаризованная питательная среда с pH 6.0, состав

Пептон	7,0 г;
Натрий хлористый	5,0 г;
Калия фосфат однозамещенный	1,0 г;
Агар-агар	12,0 г;
Дистиллированная вода	До 1000 мл
pH готовой среды	6,0±0,2

4.3. Агаризованная питательная среда с pH 7.2, состав

Пептон	7,0 г;
Натрий хлористый	5,0 г;
Натрия фосфат трехзамещенный	0,8 г;
Агар-агар	13,0 г;
Дистиллированная вода	До 1000 мл
pH готовой среды	7,2±0,2

4.3.1. Раствор триметоприма

4.3.1.1. Стоковый раствор триметоприма

Триметоприм	10,0 мг;
Этанол 96%	10,0 мл;

4.3.1.2. Рабочий раствор триметоприма*

Стоковый раствор триметоприма	10,0 мл;
Дистиллированная вода	190,0 мл;

Срок хранения – не более 14 дней при + 2-8 ºС

4.4. Агаризованная питательная среда с pH 8.0, состав

Пептон	7,0 г;
Натрий хлористый	5,0 г;
Натрия фосфат трехзамещенный	2,5 г;
Агар-агар	13,0 г;
Дистиллированная вода	До 1000 мл
pH готовой среды	8,0±0,2

4.5. Диски с антибиотиками

4.5.1. Диски с 0,5 мкг стрептомицина

4.5.2. Диски с 0,05 мкг бензилпенициллина

4.5.3. Диски с 0,5 мкг сульфадимидина

4.6. Культуры тест-штаммов микроорганизмов

4.6.1. Суспензия спор Bacillus stearothermophilus ATCC 7953 с содержанием спор $1x10^8$ КОЕ/$см^3$;

4.6.2. Суспензия спор Bacillus subtilis ATCC 6633 или DSM 618 с содержанием спор $1x10^7$ КОЕ/$см^3$;

4.6.3. Суспензия микробных клеток Micrococcus luteus АТСС 9341 с концентрацией клеток $1x10^8$ КОЕ/$см^3$.

5 Аппаратура и материалы

Микробиологическое лабораторное оборудование общего назначения ГОСТ Р ИСО 7218 и ГОСТ Р ИСО 6887-2 и в частности следующее:

5.1. Термостат, поддерживающий температуру от 30 ºС до 70 ºС с допустимой погрешностью ± 0,5 ºС.

5.2. Баня водяная с терморегулятором, поддерживающая температуру от 60 ºС до 90 ºС.

5.3. Центрифуга со скоростью вращения не менее 5000 об/мин со сменными роторами.

5.4. Линейка по ГОСТ 427 с пределом измерения 150 мм.

5.5. Пробойник диаметром 8мм.

6 Отбор проб

Метод отбора проб не входит в настоящий стандарт. При отсутствии стандарта, описывающего отбор проб исследуемого продукта, пробы отбирают по специальному соглашению между заинтересованными сторонами.

При отборе проб следует обеспечить условия, чтобы лаборатория получила пробы, которые были бы представительными и не были повреждены или изменены при транспортировании или хранении (см. ГОСТ Р ИСО 7218).

7 Подготовка проб

7.1. Ускоренный метод по Кундрату

Навески по 10 г мышечной ткани, почек, печени, легкого и т.д., вырезанные из средней части образца, измельчают ножницами или микроразмельчителем тканей с последующим растиранием в ступке со стерильным кварцевым песком. Затем в

ступку добавляют 10 см^3 соответствующего буфера, тщательно перемешивают и переносят в центрифужные пробирки. Экстракцию антибиотика проводят в течение 90 мин в термостате при температуре (37±1) ^{0}С. Затем пробы прогревают на водяной бане при температуре (65±1) ^{0}С 30 мин и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости, являющейся первым разведением 1:2, берут 1 см^3 и прибавляют 1 см^3 соответствующего буфера, получают второе разведение 1:4 и т.д. Концентрацию антибиотика определяют в надосадочной жидкости, полученной от каждого образца.

7.2. Четырех чашечный метод

С помощью пробоотборника (5.5.) в асептических условиях отбирают пробы мяса и/или внутренних органов (печень, почки). Из полученных кусков цилиндрической формы нарезают диски толщиной 2,0 мм из расчета 2 диска на 1 чашку с соответствующим агаром.

8 Процедура проведения анализа

8.1. Ускоренный метод по Кундрату

Готовят питательную среду по п. 4.1. Автоклавируют при 121 ^{0}С в течение 15 мин. Остужают ее до 55-60 ^{0}С и добавляют 1см^3 суспензии спор Bacillus stearothermophilus ATCC 7953 по п.4.6.1. на 100 см^3 питательной среды. Разливают питательную среду по чашкам Петри толщиной агара 2,0 мм (10-12 см^3 среды на чашку Петри диаметром 90 мм). С помощью пробойника по п.5.5. на поверхности застывшей агаровой среды вырезают лунки (не более 5 на чашку). Пятую лунку можно использовать для добавления контрольного раствора антибиотика.

В лунки расположенные по окружности чашки вносят по 50мкл анализируемого экстракта пробы и в отдельную лунку 50 мкл контрольного раствора антибиотика.

Чашки Петри выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин и помещают в термостат крышкой вверх и инкубируют при температуре (65±1) ^{0}С в течение 4ч. Не допускается ставить чашки друг на друга.

8.2. Четырех чашечный метод

Готовят питательные среды по п.п. 4.2.,4.3.,4.4. Автоклавируют при 121 ^{0}С в течение 15 мин. Остужают ее до 55 - 60 ^{0}С и добавляют 1,0 см^3 суспензии спор Bacillus subtilis по п.4.6.2. на 100 см^3 питательной среды. В питательную среду по п.4.3. дополнительно добавляют рабочий раствор триметоприма по п. 4.3.1.2.

Дополнительно готовят питательную среду по п. 4.4. Автоклавируют при 121 ^{0}С в течение 15 мин. Остужают ее до 45-50 ^{0}С и добавляют 1,0мл суспензии микробных клеток Micrococcus luteus АТСС 9341 по п.4.6.2. на 1000 см^3 питательной среды.

Разливают питательную среду по чашкам Петри толщиной агара 2,0 мм (12-15 см^3 среды на чашку Петри диаметром 90мм).

Используя стерильные ножницы и пинцет положите по 2 диска исследуемой пробы на поверхность каждой из четырех чашек Петри с соответствующей питательной средой друг напротив друга. В качестве положительных контрольных образцов антибиотиков на поверхность питательной среды по п.4.2. наносят диск с бензилпенициллином по п.4.5.2., питательной среды по п.4.3. наносят диск с триметопримом по п.4.5.3., питательной среды по п.4.4. наносят диск со стрептомицином по п.4.5.1.

Чашки Петри помещают в термостат крышкой вверх и инкубируют при температуре 30±1 ^{0}С в течение 18-24 ч. Не допускается ставить чашки друг на друга.

9 Обработка результатов

9.1. Ускоренный метод по Кундрату

Чашки Петри после инкубирования просматривают в проходящем свете. Наличие зоны подавления роста с не изменившей цвет средой диаметром более 2,0мм свидетельствует о наличии антибиотиков в изучаемой пробе. Диаметр зоны подавления роста измеряют с помощью линейки. Проба давшая зону подавления роста с диаметром менее 2мм учитывается как не содержащая антибиотиков.

9.2. Четырех чашечный метод

Чашки Петри после инкубирования просматривают в проходящем свете. Наличие зоны подавления роста диаметром более 2,0 мм хотя бы на одной из четырех чашек

свидетельствует о наличии антибиотиков в изучаемой пробе. Диаметр зоны подавления роста измеряют с помощью линейки. Проба, давшая зону подавления роста с диаметром менее 2 мм, учитывается как не содержащая антибиотиков.

10 Хранение и транспортировка проб

Транспортировку проб производят в герметичном термоконтейнере с охлаждающими блоками льда или блоками, содержащими дробленый лед.

Каждый образец исследуют в лаборатории не позднее одного часа после отбора пробы или помещают на хранение при температуре (2±2) ^{o}C не более чем на 24 ч (см. ИСО 7218).

УДК ОКС

Ключевые слова: мясо, продукты убоя животных, определение антибиотиков, B.stearothermophilus, B.subtilis, лекарственные препараты

Директор ГНУ ВНИИМП
им. В.М. Горбатова
Россельхозакадемии А.Б. Лисицын

Зам.директора
по научной работе А.А.Семенова

Заведующий лабораторией
гигиены производства
и микробиологии М.Ю.Минаев

Заместитель заведующего
лабораторией
гигиены производства
и микробиологии Д.С.Батаева

Младший научный сотрудник
лаборатории
гигиены производства
и микробиологии М.А.Краснова

Заведующий отделом
стандартизации
и сертификации О.А.Кузнецова