

31991D0180

13.4.1991

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 93/1

ROZHODNUTÍ KOMISE**ze dne 14. února 1991,****kterým se stanoví některé metody analýzy a testování syrového mléka a tepelně ošetřeného mléka**

(91/180/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

vzhledem k tomu, že pro sterilizované mléko a UHT mléko je nezbytné stanovit zejména metody pro stanovení obsahu mikroorganismů, nepřítomnosti antibiotik;

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 85/397/EHS ze dne 5. srpna 1985 o hygienických a veterinárních otázkách obchodu s tepelně ošetřeným mlékem uvnitř Společenství ⁽¹⁾ naposledy pozměněnou směrnicí 89/662/EHS ⁽²⁾, a zejména na čl. 10 odst. 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že z technických důvodů je vhodné nejprve stanovit referenční metody analýzy a testování, které mají zajistit dodržování určitých norem; že je zejména nezbytné pokračovat v prošetřování podmínek, za kterých se používají rutinní metody analýzy a testování; že v očekávání výsledků těchto šetření dbají členské státy na to, aby pro dodržení norem směrnice 85/397/ES byly použity vhodné rutinní metody;

vzhledem k tomu, že

vzhledem k tomu, že stanovení referenčních metod analýzy a testování zahrnuje i stanovení postupů analýzy a kritérií spolehlivosti pro zajištění jednotného výkladu výsledků;

podle čl. 10 odst. 2 Komise stanoví metody analýzy a testování, které se mají používat pro kontrolu dodržování norem pro syrové mléko a tepelně ošetřené mléko;

vzhledem k tomu, že opatření tohoto rozhodnutí jsou v souladu se stanoviskem Stálého veterinárního výboru,

vzhledem k tomu, že pro syrové mléko je nezbytné stanovit zejména metody pro stanovení obsahu mikroorganismů, obsahu buněk, bodu mrznutí a přítomnosti antibiotik;

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

vzhledem k tomu, že pro pasterované mléko je nezbytné stanovit zejména metody pro stanovení nepřítomnosti patogenů, počtu koliformních bakterií, obsahu mikroorganismů, nepřítomnosti fosfatázy, přítomnosti peroxidázy, nepřítomnosti antibiotik a bodu mrznutí;

Referenční postupy analýzy a testování pro syrové mléko jsou tyto:

- stanovení bodu mrznutí,
- stanovení obsahu mikroorganismů při 30 °C,
- stanovení obsahu somatických buněk,
- detekce antibiotik a sulfonamidů.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 226, 24.8.1985, s. 13.

⁽²⁾ Úř. věst. L 395, 30.12.1989, s. 13.

Článek 2

Referenční postupy analýzy a testování pro pasterované mléko jsou tyto:

- stanovení bodu mrznutí,
- stanovení aktivity fosfatázy,
- stanovení aktivity peroxidázy,
- stanovení obsahu mikroorganismů při 30 °C,
- stanovení obsahu mikroorganismů při 21 °C,
- stanovení obsahu koliformních bakterií – počítání kolonií při 30 °C,
- detekce antibiotik a sulfonamidů,
- detekce patogenních mikroorganismů.

Článek 3

Referenční postupy analýzy a testování pro UHT mléko a sterilizované mléko jsou tyto:

- stanovení bodu mrznutí,
- stanovení obsahu mikroorganismů při 30 °C,
- detekce antibiotik a sulfonamidů.

Článek 4

Použití referenčních postupů analýzy a testování, stanovení kritérií spolehlivosti a odběr vzorků se musí provést podle pravidel stanovených v příloze I.

Článek 5

Referenční postupy analýzy a testování uvedené v člancích 1, 2 a 3 jsou popsány v příloze II.

Článek 6

Toto rozhodnutí bude přezkoumáno do 31. prosince 1992, aby se zohlednil vývoj vědeckých a technických znalostí.

Článek 7

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu dne 14. února 1991.

Za Komisi

Ray MAC SHARRY

člen Komise

PŘÍLOHA I

OBSAH

	Strana
I. Obecná ustanovení	187
II. Odběr vzorků syrového a tepelně ošetřeného mléka	189

I. OBECNÁ USTANOVENÍ

1. Úvod

Obecná ustanovení se týkají činidel, přístrojů a pomůcek, vyjádření výsledků, kritérií spolehlivosti a zpráv o testování. Příslušné orgány členských států a laboratoře pověřené odběrem vzorků a testováním mléka musí dodržovat tato ustanovení.

2. Činidla

2.1 Voda

2.1.1 Pokud není stanoveno jinak, voda použitá k rozpouštění, ředění nebo mytí musí být povinně voda destilovaná, deionizovaná nebo demineralizovaná alespoň odpovídající čistoty. Pro mikrobiologické účely musí být bez látek, které mohou poškodit nebo jinak ovlivnit růst mikroorganismů za popsanych testovacích podmínek.

2.1.2 „Rozpouštěním“ nebo „ředěním“ (bez dalšího upřesnění) se rozumí „rozpouštění ve vodě“ nebo „ředění vodou“.

2.2 Chemikálie

Pokud není stanoveno jinak, všechny používané chemikálie musí mít být uznané analytické jakosti.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Seznam přístrojů a pomůcek

Příslušný seznam přístrojů a pomůcek pro různé referenční metody se týká přístrojů a pomůcek ke zvláštnímu použití a se zvláštní specifikací.

3.2 Analytické váhy

„Analytickými vahami“ se rozumí váhy s přesností vážení na 0,1 mg.

4. Vyjádření výsledků

4.1 Výsledky

Pokud není stanoveno jinak, výsledek uvedený ve zprávě o testování musí být aritmetickým průměrem dvou testů, které splňují kritérium opakovatelnosti (5.1) pro příslušnou metodu. Když není toto kritérium opakovatelnosti splněno, test se musí opakovat, jinak je výsledek neplatný.

4.2 Výpočet procentuálního podílu

Pokud není stanoveno jinak, výsledek se vypočítá v procentech hmotnosti vzorku.

5. Kritéria spolehlivosti: opakovatelnost a reprodukovatelnost

5.1 Kritéria spolehlivosti uvedená pro každý postup jsou definována takto:

5.1.1 *Opakovatelnost* (r) je hodnota, pod kterou se nachází absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma samostatnými výsledky testu, které byly získány stejným postupem s identickým výrobkem za stejných podmínek (stejný pracovník, stejný přístroj, stejná laboratoř, krátké časové období).

5.1.2 *Reprodukovatelnost* (R) je hodnota, pod kterou leží absolutní rozdíl dvou výsledků samostatných testů, získaných totožným postupem s týmž testovacím materiálem za odlišných podmínek (různí pracovníci, různé přístroje, různé laboratoře a/nebo různé doby).

5.1.3 Pokud není stanoveno jinak, hodnoty pro kritéria opakovatelnosti a reprodukovatelnosti, uváděné v příslušných odstavcích každého postupu, představují 95 % intervaly úrovně spolehlivosti podle definice ISO 5725, druhé vydání, 1986. Jsou vypočteny z výsledků uznaných pokusů, prováděných ve spolupráci, které se používají pro hodnocení postupu. Pro některé postupy však tyto pokusy, prováděné ve spolupráci, nebyly provedeny. V tom případě byly hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti odhadnuty.

5.1.4 Kruhové testy a nezbytné studie by měly být naplánovány a uskutečněny v souladu s mezinárodními pokyny.

6. Zpráva o testování

Zpráva o testování musí upřesnit použitý postup a získané výsledky. Mimo jiné musí uvádět všechny podrobnosti postupu, které nejsou upřesněny v metodě testu, nebo volitelné podrobnosti a všechny okolnosti, které by mohly ovlivnit výsledky. Zpráva o testování obsahuje všechny informace umožňující úplnou identifikaci vzorku.

II. ODBĚR VZORKŮ SYROVÉHO A TEPELNĚ OŠETŘENÉHO MLÉKA

1. Předmět a oblast použití

Tento postup popisuje referenční postup pro odběr vzorků syrového a tepelně ošetřeného mléka. Tento postup pro odběr vzorků, přeprava a skladování vzorků se použijí pro syrové mléko dodané producenty a pro syrové a tepelně ošetřené mléko skladované ve skladovacích a přepravních nádržích.

Postupy uvedené v bodech 2, 4.4, 5 a 6 se použijí pro odběr vzorků tepelně ošetřeného mléka určeného k přímé spotřebě.

2. Obecně

Odběr vzorků syrového a tepelně ošetřeného mléka obsaženého v konvích, nádržích apod. provedou pověřeni zaměstnanci, kteří byli před odběrem vzorků vhodně vyškoleni.

Pokud to příslušné orgány nebo testovací laboratoř považují za nezbytné, vyškolí zaměstnance pověřené odběrem vzorků v metodách odběrů, aby bylo jisté, že odebrané vzorky budou reprezentativní a v souladu s celou šarží.

Pokud to příslušné orgány nebo testovací laboratoř považují za nezbytné, vyškolí zaměstnance pověřené odběrem vzorků v označování vzorků, aby identifikace vzorků byla jednoznačná.

3. Vybavení pro odběr vzorků

3.1 Obecné údaje

Vybavení pro odběr vzorků musí být nejen zhotoveno z nerezové oceli nebo z jiného vhodného, dostatečně odolného materiálu, ale musí být vyrobeno s ohledem na předpokládané použití (promíchání, odběr vzorků, atd.). Plunžry a míchačky pro míchání kapalin v nádobách musí mít dostatečně velkou plochu povrchu, aby bylo zajištěno dostatečné promíchání výrobku bez vzniku žluklé chuti. Naběračky musí být opatřeny pevnou, dostatečně dlouhou rukojetí k nabírání vzorků z jakékoli hloubky nádoby. Objem naběračky musí být alespoň 50 ml.

Vzorkovnice a víčka musí být skleněná, kovová nebo z vhodného plastu.

Materiály použité při výrobě vybavení pro odběr vzorků (včetně nádob a víček) nesmí způsobit takovou změnu vzorku, která by ovlivnila výsledky testů. Vlastní materiál a nádoby na vzorky musí mít čistý, suchý, hladký povrch bez trhlin a musí mít zakulacené hrany.

3.2 Vybavení pro odběr vzorků pro mikrobiologické vyšetření

Vybavení pro odběr vzorků (včetně nádob) musí splňovat ustanovení bodu 3.1 a musí být sterilní.

Pokud se pro sobě jdoucí odběry vzorků použije totéž vybavení, musí být po každém odběru vzorku vyčištěno a sterilizováno v souladu s pokyny nebo požadavky, které stanoví testovací laboratoř nebo příslušný orgán, aby nedošlo k ovlivnění výsledků po sobě jdoucích vzorků.

4. Technika odběru vzorků

4.1 Obecné údaje

Bez ohledu na testy, které mají být provedeny, mléko musí být před odběrem důkladně promícháno buď ručně, nebo mechanicky.

Vzorek musí být odebrán ihned po promíchání, když je mléko ještě v pohybu.

Pokud se z nádrže odebírá zároveň více vzorků mléka pro různé testy, jako první musí být odebrán vzorek pro mikrobiologické vyšetření.

Objem vzorku musí odpovídat potřebám testování. Objem použitých nádob musí být takový, aby byly tyto nádoby téměř naplněny vzorkem a při tom bylo možné dobře promíchat obsah před testováním, aniž by však hrozilo nebezpečí stloukání másla během přepravy.

4.2 *Ruční odběr vzorků*

4.2.1 *Odběr vzorků z věder a konví na mléko*

K rychlému promíchání pohybovat plunžrem ve vědru nebo konvi nahoru a dolů, přičemž dbát na to, aby se mléko řádně promíchalo a aby se na hrdle konve nezachytila smetana. Vzorek, který je reprezentativní pro celou zásilku, se odebere postupem podle bodu 4.2.4.

4.2.2 *Odběr z chlazených nádrží na mléko v zemědělském podniku*

Míchat mléko mechanicky nebo ručně dokud není dosaženo dostatečné homogenity.

Pokud objem mléka neumožňuje použití mechanické míchačky, míchat ručně.

4.2.3 *Odběr vzorků z misky vah*

Je nezbytné, aby mléko bylo řádně promícháno, když se nalije do misky vah. Za účelem zajištění rovnoměrného rozdělení tuku může být nezbytné další ruční nebo mechanické míchání. Pokud objem zásilky, z níž se má odebrat vzorek, přesáhne kapacitu misky vah, odebrat reprezentativní vzorek z celé zásilky postupem podle bodu 4.2.4.

4.2.4 *Odběr vzorků z rozdělené šarže*

Když je množství mléka, u něhož se má provést odběr vzorků, rozděleno do více nádob, z každé nádoby se odebere reprezentativní množství, přičemž se zaznamená množství mléka pro každý vzor. Pokud vzorky z každé nádoby nemusí být odděleně testovány, smíchají se jednotlivé dávky těchto reprezentativních množství v poměru k množství, které se nachází v nádobě, ze které byl každý ze vzorků odebrán. Po promíchání se odebere jeden (více) vzorek (vzorků) z těchto poměrných množství.

4.2.5 *Odběr vzorků z velkých nádob – skladovací nádrže, cisternové kamiony, cisternové vagóny*

4.2.5.1 *Před odběrem vzorků se mléko vhodným způsobem promíchá.*

K promíchání obsahu velkých nádob, skladovacích nádrží, cisternových kamionů nebo cisternových vagónů se doporučuje mechanické promíchání (4.2.5.2).

Délka promíchání závisí na době, po kterou bylo mléko v klidu. Musí být prokázáno, že postup promíchání použitý v každém z jednotlivých případů je vhodný pro potřeby plánovaného testování. Účinnost promíchání značně ovlivňuje shodu výsledků testů provedených na vzorcích odebraných buď z různých částí šarže, nebo v pravidelných intervalech při vyprazdňování mléka z nádob. Způsob promíchání mléka (syrového mléka nebo plnotučného mléka) je účinný, pokud je rozdíl obsahu tuku u obou vzorků odebraných za těchto podmínek menší než 0,1 %.

Ve velké nádobě s vypouštěcím otvorem ve spodní části může v místě vypouštění zůstat malé množství mléka, které ani po promíchání není reprezentativní pro celý obsah. Proto se upřednostňuje odběr vzorků z průřezového otvoru. V případě odběru vzorků z vypouštěcího otvoru je třeba nechat vytéci dostatečné množství mléka, aby byla zajištěna reprezentativnost vzorků.

4.2.5.2 *Promíchání obsahu velkých nádob nebo skladovacích nádrží, cisternových kamionů a cisternových vagónů je možné provést:*

- mechanickou míchačkou zabudovanou do nádoby a poháněnou elektrickým motorem,
- vrtulí nebo míchačkou poháněnou elektrickým motorem a umístěnou v průřezovém otvoru; míchačka je ponořena v mléce,
- v případě cisternových kamionů nebo cisternových vagónů recyklací mléka v ohebné přepravní hadici, která je napojena na pumpu a zavedena do průřezového otvoru,
- filtrovaným, stlačeným a čistým vzduchem. Použije se minimální tlak a objem vzduchu, aby se zabránilo vniku žluklé chuti.

4.3 *Automatický a poloautomatický odběr vzorků*

Automatické a poloautomatické vybavení pro odběr vzorků syrového mléka dodaného producenty se může použít podle pokynů stanovených testovací laboratoří nebo jiným příslušným orgánem.

Takové vybavení musí být před a během používání podrobeno pravidelným kontrolám, které předepíše odpovědný orgán. Vhodnost postupů odběru vzorků musí být ověřena s cílem stanovit:

- minimální objem sebraného mléka, z něhož musí být odebrán vzorek,
- poměr jakéhokoli přenosu (který souvisí s minimálním objemem vzorku),
- schopnost poskytnout reprezentativní vzorek z šarže po řádném promíchání.

Pro používání automatického nebo poloautomatického vybavení pro odběr vzorků může příslušný odpovědný vnitrostátní orgán předepsat:

- minimální objem mléka, ze kterého musí být odebrány vzorky,
- minimální objem vzorku,
- maximální přenos,
- testování, které může být provedeno, nebo speciální preventivní opatření, která je nutné přijmout.

4.4 Odběr vzorků tepelně ošetřeného mléka určeného k přímé lidské spotřebě a upraveného v maloobchodních baleních

Pokud jde o tepelně ošetřené mléko určené k přímé lidské spotřebě a upravené v maloobchodních baleních, vzorky se povinně skládají z nepoškozených, zapečetěných nádob. Vzorky musí být odebrány během obchodní úpravy nebo z chladírenské místnosti zařízení pro ošetření, a to, pokud je to možné, ihned po zpracování (v případě pasterovaného mléka v den pasterace).

Z každého druhu tepelně ošetřeného mléka (pasterovaného, ošetřeného metodou UHT a sterilizovaného) se odebere takový počet vzorků, aby odpovídal počtu vyšetření, která mají být provedena, a to podle pokynů poskytnutých testovací laboratoří nebo podle pokynů jiného příslušného orgánu.

5. Identifikace vzorku

Vzorek by měl být označen identifikačním kódem, který umožňuje jeho rychlou identifikaci podle pokynů analytických laboratoří nebo příslušného orgánu (viz bod 2).

6. Přeprava a skladování vzorků

Se souhlasem příslušného vnitrostátního orgánu připraví testovací laboratoř pokyny týkající se lhůty a podmínek přepravy a skladování, které mají být dodrženy v době mezi odběrem vzorků jejich testováním, a to na základě druhu mléka a testování, které má být použito.

Pokyny stanoví toto:

- během přepravy a skladování je třeba dbát na to, aby vzorky nebyly vystaveny nežádoucímu zápachu a přímému slunečnímu světlu. Je-li je nádoba použita pro vzorek průsvitná, musí být skladován ve tmě,
- vzorky syrového mléka určené pro mikrobiologické testování musí být přepravovány a skladovány při teplotách 0 °C až 4 °C. Doba mezi odběrem a testováním musí být co nejkratší a v žádném případě nesmí přesáhnout 36 hodin. Příslušný orgán může souhlasit, aby byla teplota skladování 0 °C až 6 °C, není-li doba mezi odběrem a testováním delší než 24 hodin,
- vzorky pasterovaného mléka určené pro mikrobiologické testování musí být přepravovány a skladovány při teplotách 0 °C až 4 °C. Doba mezi odběrem a testováním musí být co nejkratší a v žádném případě nesmí přesáhnout 24 hodin,
- jiné vzorky mléka než vzorky syrového mléka a pasterovaného mléka určené pro mikrobiologickou analýzu musí být skladovány v chladicím zařízení laboratoře a doba mezi odběrem vzorku a analýzou musí být co nejkratší.

Speciální preventivní opatření, která je nutné přijmout pro některé testy, jsou uvedena v popisu různých použitelných postupů.

PŘÍLOHA I

OBSAH

	Strana
I. Stanovení bodu mrznutí.....	193
II. Stanovení aktivity fosfatázy	199
III. Stanovení aktivity peroxidázy	202
IV. Stanovení obsahu mikroorganismů při 30 °C	203
V. Stanovení obsahu mikroorganismů při 21 °C	208
VI. Stanovení obsahu koliformních bakterií – počítání kolonií při 30 °C	212
VII. Stanovení obsahu somatických buněk	216
VIII. Detekce antibiotik a sulfonamidů	222
IX. Detekce patogenních mikroorganismů	231

I. STANOVENÍ BODU MRZNUTÍ

1. Předmět a oblast použití

Tato kapitola popisuje referenční postup pro stanovení bodu mrznutí plnotučného, polotučného, odstředěného, syrového, pasterovaného, UHT mléka nebo sterilizovaného mléka pomocí přístroje (termistorového kryoskopu), v němž je termostatem řízená lázeň ochlazována elektrickým chladicím zařízením a termistorový snímač nahrazuje rtuťový teploměr.

K dispozici jsou dva typy přístroje. První typ vyhledává maximální bod mrznutí na plató křivky mrznutí, kdežto druhý typ je z obchodních důvodů nastaven tak, že po začátku mrznutí provádí ve stanovenou dobu odečet. Vzhledem k tomu, že se mohou lišit nejen křivky bodu mrznutí různých druhů mléka, ale i křivky bodu mrznutí mléka a standardních roztoků použitých pro kalibraci, tento referenční postup vyžaduje použití přístrojů hledajících plató. Přístroje s pevně stanoveným časem se mohou používat v případě rutinního testování.

Bod mrznutí lze využít pro odhad podílu příměsi cizí vody v mléce za předpokladu, že kyselost vzorku není vyšší než 0,18 g kyseliny mléčné na 100 ml (viz bod 7.4).

2. Definice

Bod mrznutí mléka: hodnota naměřená v souladu s popsáním postupem a vyjádřená ve stupních Celsia (°C).

3. Princip

Testovací vzorek mléka se v závislosti na přístroji podchladí na vhodnou teplotu a mechanickou vibrací se vyvolá jeho krystalizace, která způsobí, že teplota rychle stoupne až k plató, které odpovídá bodu mrznutí vzorku.

Přístroj se kalibruje takovým způsobem, aby se stejným postupem jako pro vzorky mléka získaly přesné odečty pro dva standardní roztoky. Za těchto podmínek plató udává bod mrznutí mléka ve stupních Celsia.

4. Přístroje a pomůcky ze skla

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1 Kryoskop

Kryoskop se skládá z termostatem řízené chladicí lázně, termistorového snímače (polovodičového odporového teploměru) s příslušným obvodem, galvanometru nebo jiného odečítacího zařízení, míchačky na vzorky a zařízení na vyvolání mrznutí, jakož i ze zkumavek na vzorky.

4.1.1 Chladicí lázeň

Je možné použít dva typy chladicí lázně.

4.1.1.1 Imersní typ

Dobře izolovaná lázeň obsahující vhodnou chladicí kapalinu, která se míchá tak, aby teplotní rozdíl mezi jakýmkoli dvěma body v kapalině nebyl vyšší než 0,2 °C. Teplota kapaliny může kolísat nejvýše v rozmezí $\pm 0,5$ °C od nominální hodnoty určené výrobcem.

Je důležité, aby v lázni byla udržována konstantní hladina kapaliny. Celá plocha zkumavky na vzorky pod značkou objemu musí být pokryta chladicí kapalinou.

4.1.1.2 Cirkulační typ

Kolem zkumavky na vzorky proudí nepřetržitý proud vhodné chladicí kapaliny. Teplota kapaliny může kolísat nejvýše v rozmezí $\pm 0,5$ °C od nominální hodnoty určené výrobcem.

Vhodnou chladicí kapalinou je 33 % (V/V) vodný roztok 1,2-ethandiolu (ethylenglykolu).

4.1.2 Termistor a příslušný obvod

Termistor se skládá ze skleněné sondy o maximálním průměru $1,80 \pm 0,2$ mm a o průměru vodiče maximálně 0,31 mm. Časová konstanta termistoru musí být nižší než 2 sekundy a hodnota b (viz poznámka) musí být vysoká. Pracovní napětí, proud a konstanta rozptylu musí být takové, aby při $-0,512$ °C teplota termistoru stoupla nad teplotu okolí maximálně o 0,0005 °C. Maximální tolerance odporu může být ± 5 %.

Když je sonda v kryoskopu v pracovní poloze, konec skleněné kuličky se musí nacházet v ose zkumavky na vzorky a v bodě, který je $44,6 \pm 0,1$ mm pod horním okrajem zkumavky (viz obrázek na straně 15). Je třeba dodat odstředivku, aby se usnadnilo nastavení sondy do této polohy.

Poznámka:

β definuje termické vlastnosti termistoru podle vzorce

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2}$$

kde:

T je teplota ve stupních Kelvina

R je odpor v ohmech při teplotě T ,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} \text{ teplotní koeficient}$$

β je konstanta, která závisí na materiálu použitém při výrobě termistoru. V běžné praxi se doporučuje hodnota vyšší než 3 000.

4.1.3 Měřicí a odečítací zařízení

4.1.3.1 Princip měření

Použitý přístroj pracuje na principu vyhledávání prvního plató na křivce bodu mrznutí. Plató je část křivky, kde teplota zůstane konstantní s přesností na $\pm 0,002$ °C po dobu nejméně 20 sekund.

4.1.3.2 Ruční obsluha

Odpor termistoru se vyrovnává Wheatstoneovým můstkem nebo podobným zařízením pomocí nejlepších konstantních odporů, jejichž maximální tolerance je ± 10 % a jejichž teplotní koeficient není vyšší než 2×10^{-5} °C

Proměnný (vyrovnávací) odpor se nesmí odchýlit od linearity v celém rozsahu o více než o 0,3 % své maximální hodnoty.

Pro účely kalibrace musí být možné odpory upravit.

Měřicí stupnice je rozdělena dílky po maximálně 0,001 °C.

4.1.3.3 Automatický provoz

Odečítací zařízení musí umožnit rozlišení na nejméně 0,01 °C v rozmezí od 0 °C do -1 °C.

Stabilita odečítacího zařízení a jeho příslušného obvodu musí být taková, aby odchylka dvou po sobě následujících odečtů téže teploty nebyla vyšší než 0,001 °C.

Linearita obvodu musí být taková, aby při správné obsluze přístroje nevznikla v žádném bodě rozmezí od $-0,400$ °C do $-0,600$ °C větší chyba než $\pm 0,001$ °C.

4.1.4 Míchačka

Pro míchání testovacího vzorku se použije kovový drát o průměru 1 až 1,5 mm, který nereaguje s mlékem.

Míchačka by měla být nastavena na rozkmit a umístěna vertikálně tak, aby její spodní konec byl na úrovni hrotu sondy termistoru. Přípustná tolerance je asi 1,5 mm nad či pod touto polohou.

Míchačka vibruje bočně s dostatečným rozkmitem určeným výrobcem (nejméně $\pm 1,5$ mm), aby byla zajištěna jednotná teplota testovacího vzorku během stanovení. Během míchání se míchačka nesmí v žádném okamžiku dotknout sondy termistoru nebo stěny zkumavky.

4.1.5 Zařízení na vyvolání mrznutí

Může to být jakékoli zařízení, které po uvedení do činnosti okamžitě vyvolá mrznutí vzorku, aby teplota tohoto testovacího vzorku stoupla k bodu mrznutí. K tomu účelu lze použít míchačku; jedním postupem je zvětšení rozkmitu vibrací na jednu až dvě sekundy tak, aby se míchačka dotýkala stěny zkumavky na vzorky.

4.1.6 Zkumavky na vzorky

Zkumavky na vzorky (viz obrázek 1) jsou skleněné a $50,8 \pm 0,1$ mm dlouhé; vnější průměr je $16,0 \pm 0,1$ mm a vnitřní průměr je $13,5 \pm 0,1$ mm. Tloušťka skla zkumavky se nesmí lišit o více než 0,1 mm.

Zkumavky musí mít značku objemu vzdálenou od horního okraje 29,8 mm (21 mm nad dnem zkumavky), která uvádí objem vzorku $2,5 \pm 0,1$ mm.

4.1.7 Zdroj elektřiny

Zdroj napětí musí být stabilizován buď uvnitř nebo vně přístroje tak, aby případná kolísání nepřekračovala ± 1 % nominální hodnoty, když hlavní zdroj kolísá o ± 6 %.

4.2 Analytické váhy

4.3 Odměrné baňky o objemu 1 000 ml, třída A.

4.4 Sušárna, dobře odvětraná, nastavitelná na 130 ± 1 °C

nebo

Elektrická pec, odvětraná, nastavitelná na 300 ± 25 °C.

4.5 Exsikátor

5. Činidla

5.1 Voda destilovaná v borosilikátovém skle, převařená a zchlazená na 20 ± 2 °C, ve zkumavce absorbující oxid uhličitý.5.2 Chlorid sodný, čistoty p.a., jemně mletý, sušený 5 hodin při teplotě 300 ± 25 °C v elektrické peci nebo nejméně 24 hodin při teplotě 130 ± 1 °C v sušárně a zchlazený na pokojovou teplotu v účinném exsikátoru.

5.3 Příprava standardních roztoků

Navážit odpovídající množství (viz tabulka 1) suchého chloridu sodného (5.2) do váženky. Rozpustit v destilované vodě (5.1), kvantitativně přelít roztok do odměrné baňky o objemu 1 000 ml a doplnit po značku vodou o teplotě 20 ± 2 °C.

Skladovat roztoky nejdéle dva měsíce při asi 5 °C v dobře uzavřených polyethylenových lahvích o maximálním objemu 250 ml.

Bod mrznutí roztoků chloridu sodného při 20 °C

g NaCl/l	°C
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Před použitím se standardní roztok opatrně promíchá protřepáním a několikerým otočením láhve. Nikdy neprotřepávat standardní roztok tak prudce, aby se do roztoku přimíchal vzduch.

Vzorky standardního roztoku se z láhve vylíjí do suché a čisté kádinky. Nikdy nepoužívat pipety.

Nepoužívat roztoky z lahví, které byly ze tří čtvrtin prázdné, a nepoužívat roztoky starší dvou měsíců, pokud neobsahují fungicid (například roztok thiomersalu 10 g/l).

6. Kalibrace termistorového kryoskopu

Kryoskop musí být nastaven tak, aby se okolní teplota nelišila o více než 1 °C od teploty, při níž se provádí kalibrace. Kryoskop nesmí být vystaven slunečnímu světlu, průvanu nebo pokojovým teplotám vyšším než 26–27 °C.

Ujistit se, že kryoskop funguje podle pokynů výrobce a že byl zapnut nejméně 12 hodin před kalibrací. Zkontrolovat polohu sondy, rozkmit vibrační míchačky a teplotu chladicích kapalin.

Vybrat dva standardní roztoky (viz tabulka výše), jejichž bod mrznutí je těsně nad nebo těsně pod očekávanou hodnotou bodu mrznutí vzorků mléka k testování. Rozdíl mezi body mrznutí obou roztoků by nejlépe neměl být vyšší než – 0,100 °C.

(U některých typů v současné době dostupných kryoskopů je příslušný obvod termistoru sestaven tak, že se ustálí na dané hodnotě bodu mrznutí v rámci rozsahu měřicího zařízení. V těchto případech výběr jednoho standardního roztoku, který má tento bod mrznutí, jako jednoho z kalibračních roztoků usnadňuje kalibrační postup; výrobce musí tuto hodnotu uvést).

Pomocí pipety přidat $2,5 \pm 0,1$ ml jednoho standardního roztoku do suché a čisté zkumavky na vzorky, poté měřit pomocí kryoskopu.

Poznámka:

Zkumavky na vzorky používané při kalibraci jsou vyrobeny a ošetřeny jako zkumavky používané na vzorky mléka (stejný druh skla, umyté a opláchnuté demineralizovanou vodou). Teploty standardních roztoků jsou stejné jako teploty vzorků mléka.

Podle pokynů výrobce provádět kontroly kalibrace, dokud odečet z kryoskopu nebude roven bodu mrznutí standardního roztoku. Opakovat tento postup s druhým standardním roztokem a střídavě ho provádět takovým způsobem, dokud po sobě následující odečty pro každý roztok nevykazují správné hodnoty bodu mrznutí každého z nich, aniž by byla nutná dodatečná nastavení. Kryoskop je tedy připraven k použití a přímo ukazuje bod mrznutí vzorku mléka, aniž by byla nutná jakákoli úprava.

7. Příprava testovacího vzorku

7.1 Pokud to je nezbytné skladovat vzorky při teplotě mezi 0 °C a 5 °C.

7.2 Pokud to je nezbytné filtrací odstranit všechna viditelná cizí tělíška nebo tuhý mléčný tuk ve vzorku do čisté a suché nádoby a vzorek opatrně promíchat. Pokud se použije filtr, nesmí reagovat s mlékem a musí být účinný za laboratorní teploty.

7.3 Mléko může být testováno při skladovací teplotě (mezi 0 a 5 °C) nebo je možné ho ohřát na laboratorní teplotu bezprostředně před zahájením testování. Je však nezbytné dbát na to, aby standardní roztoky a vzorky mléka měly při použití stejnou teplotu.

7.4 Stanovit titrační kyselost mléka, pokud možno současně se stanovením bodu mrznutí. Vzorky, jejichž kyselost přesahuje 0,18 g kyseliny mléčné na 100 ml mléka, nemohou být vyšetřovány.

7.5 UHT mléko a sterilizované mléko musí stát nejméně 20 minut před vyšetřením v otevřené nádobě.

8. Postup

8.1 Předběžné kontroly

Zkontrolovat, zda hladina a teplota chladicí kapaliny jsou v souladu s pokyny výrobce, případně zda se sonda termistoru nachází v prázdné zkumavce na vzorky. Zapnout kryoskop a ujistit se, zda se chladicí kapalina správně míchá nebo pohybuje. Pokud byl kryoskop zapnut alespoň 12 hodin, zkontrolovat teplotu chladicí kapaliny, polohu míchačky a vibrační rozkmit jeho vibrací.

8.2 Rutinní kontrola kalibrace

Před každou sérií testů měřit bod mrznutí standardního roztoku chloridu sodného (například roztok s bodem mrznutí $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$), dokud se hodnoty získané při dvou po sobě následujících měřeních nebudou lišit o více než $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud se průměr těchto hodnot liší od bodu mrznutí standardního roztoku o více než $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$, kryoskop se znovu kalibruje, jak je popsáno v bodě 6.

Pokud se kryoskop používá nepřetržitě, rutinní kontrola kalibrace se provádí nejméně jednou za hodinu, přičemž se zohlední pokyny výrobce.

8.3 Stanovení bodu mrznutí mléka

Promíchat láhev se vzorkem mléka opatrným protřepáním a několikerým otáčením. Nikdy neprotřepávat standardní roztok tak prudce, aby se do roztoku přimíchal vzduch.

Pomocí pipety přidat $2,5 \pm 0,1$ ml mléka do suché a čisté zkumavky na vzorky. Ujistit se, že jsou sonda a míchačka čisté a suché, pokud je to nezbytné opatrně je otřít směrem odspoda nahoru jemnou, čistou a chlupy nepouštějící látkou.

Vložit zkumavku se vzorkem do kalibrovaného kryoskopu podle pokynů výrobce. Mléko se zchladí a mrznutí se vyvolá při teplotě určené výrobcem s přesností na $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(U některých automatických přístrojů je možné odečíst tuto teplotu z digitálního ukazatele; u ručních přístrojů se nezbytné přesnosti dosáhne tím, že se zajistí, aby mrznutí začalo, když se ručička nebo nitka galvanometru kryje s příslušnou značkou.)

Pokud z jakéhokoli důvodu mrznutí začne dříve nebo později, než je dosaženo stanoveného teplotního rozmezí, testování se ukončí a zopakuje se s jiným vzorkem mléka. Pokud tento druhý vzorek rovněž ztuhne před dosažením stanovené teploty, alikvótní dávka vzorku se zahřeje na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 minut se udržuje na této teplotě, aby se rozpustil krystalický tuk.

Poté zchladit vzorek na testovací teplotu a ihned provést testování. Teplota mléka po začátku mrznutí rychle stoupne až na hodnotu, která zůstane po určitou dobu konstantní, a poté klesne. Bod mrznutí odpovídá maximální teplotě dosažené během této doby a tuto hodnotu je nutné zaznamenat.

Poznámka:

Doba, po kterou teplota zůstává konstantní, a časový interval mezi začátkem mrznutí a dosažením maximální teploty, se liší vzorek od vzorku a pro vodu a standardní roztoky chloridu sodného jsou podstatně kratší než pro mléko. Je nezbytné zaznamenat maximální teplotu.

Když je měření uspokojivě provedeno, vyjmout zkumavku, opláchnout ji vodou a otřít sondu a míchačku směrem odspoda nahoru jemnou, čistou a chlupy nepouštějící látkou a provést druhé stanovení u jiného vzorku mléka.

Pokud je rozdíl mezi naměřenými body mrznutí větší než hodnota opakovatelnosti ($0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$), provést druhé stanovení u jiného vzorku. Pokud jsou hodnoty obou stanovení shodné na $0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$, zapíše se a použije se pro výpočet konečného výsledku.

8.4 Chlazení sondy

Po použití přístroje uložit prázdnou zkumavku na vzorky na místo pro vzorky a snížit provozní teplotu, aby sonda zůstala v chladu.

(U některých typů kryoskopu to není možné; v takových případech je nezbytné se ujistit, zda je sonda před začátkem měření řádně zchlazena, například prováděním několika slepých stanovení, dokud se nezískají shodné údaje.)

9. Vyjádření výsledků

9.1 Výpočet

Pokud je po provedení rutinní kontroly kalibrace kalibrace potvrzena, za výsledek se považuje průměr obou dvou přijatelných hodnot získaných pro bod mrznutí, zaokrouhlený na tři desetinná místa.

Pokud součet obou dvou přijatelných hodnot stanovení provedených duplicitně je liché číslo, je třeba průměr zaokrouhlit na nejbližší sudou hodnotu, jak ukazuje tento příklad:

Bod mrznutí (°C)		
Hodnoty duplicitního stanovení		Průměr
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

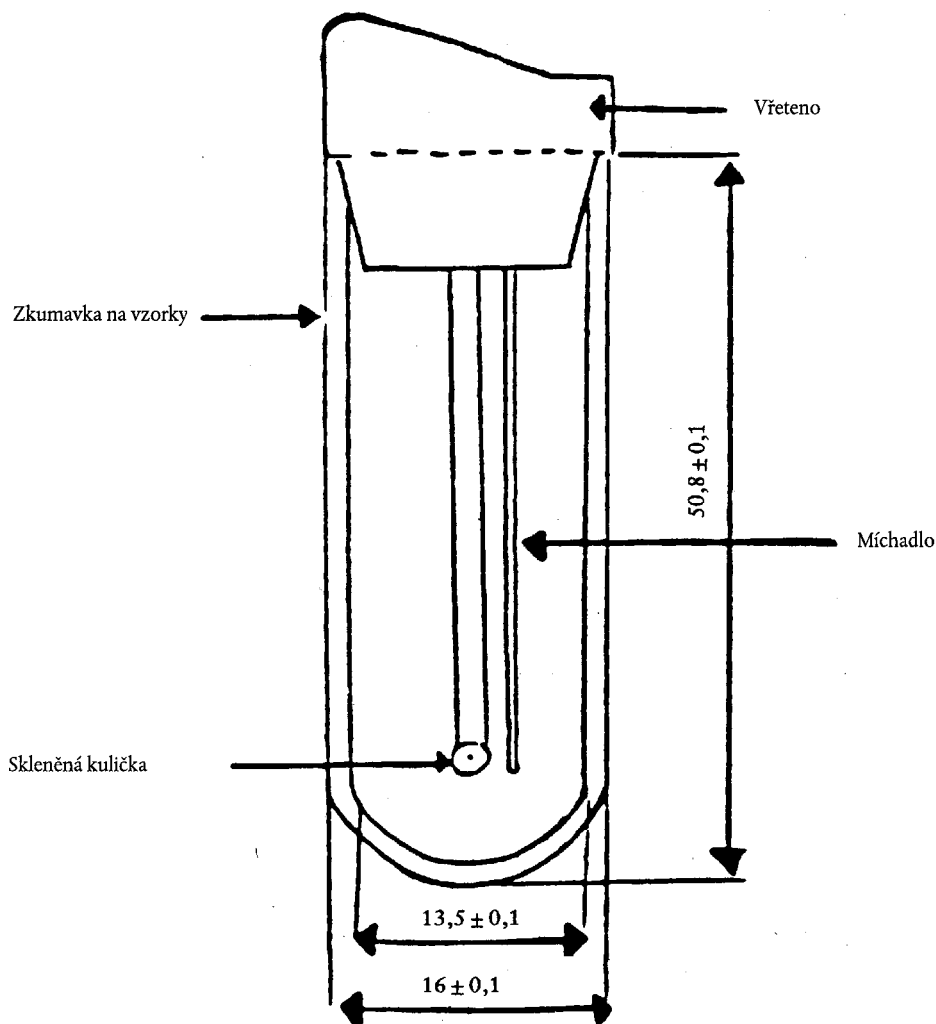
9.2 Spolehlivost

9.2.1 Opakovatelnost (r): 0,004 °C

9.2.2 Reprodukovatelnost (R): 0,006 °C

Obrázek 1

Schéma termistorového kryoskopu 4.1 (poloha zkumavky na vzorky vzhledem ke skleněné kuličce termistoru a míchadce)



Všechny rozměry jsou v milimetrech

II. STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATÁZY

1. Předmět a oblast použití

Tato kapitola popisuje referenční postup pro stanovení aktivity fosfatázy v pasterovaném mléce.

2. Definice

2.1 Aktivita fosfatázy je míra aktivní alkalické fosfatázy přítomné ve výrobku. Je vyjádřena množstvím fenolu v μg na 1 ml pasterovaného mléka za popsanych podmínek.

2.2 Aktivita fosfatázy mléka je negativní, pokud je nižší než 4 mg fenolu na 1 ml.

3. Princip

Aktivita fosfatázy ve vzorku uvolní fenol z přidaného fenylfosfátu dvojsodného. Uvolněný fenol reaguje s dibromchinonchlorimidem a vznikne dibromindofenolu (namodralé barvy), který se kolorimetricky měří při 610 nm. Poté se provádí porovnání se vzorkem, jehož enzym fosfatázy byl zničen.

4. Činidla

4.1 Tlumivý roztok boritanu a hydroxidu barnatého

4.1.1 Rozpustit ve vodě 50,0 g hydroxidu barnatého (oktahydrátu) $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ a doplnit na 1 000 ml.

4.1.2 Rozpustit ve vodě 22,0 g kyseliny borité (H_3BO_3) a doplnit na 1 000 ml.

4.1.3 Zahřát 500 ml každého roztoku na 50 °C, oba roztoky smíchat, promíchat, rychle zchladit asi na 20 °C, v případě nutnosti upravit hodnotu pH na $10,6 \pm 0,1$ přidáním roztoku 4.1.1 nebo 4.1.2. Přefiltrovat. Skladovat roztok ve vzduchotěsně uzavřené nádobě.

4.1.4 Před použitím zředit roztok stejným objemem vody.

4.2 Tlumivý roztok pro vyvolání zabarvení

Rozpustit ve vodě 6,0 g methaboritanu sodného (NaBO_2) nebo 12,6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 20,0 g chloridu sodného (NaCl) a doplnit na 1 000 ml.

4.3 Tlumivý roztok pro zředění vzniklého zabarvení

Zředit 10 ml tlumivého roztoku pro vyvolání zabarvení (4.2) vodou na 100 ml.

4.4 Roztok substrátu

Rozpustit 0,1 g fenylfosfát dvojsodný bezvodý, prostý fenolu, ve 100 ml tlumivého roztoku (4.1.3) nebo 0,5 g fenylfosfátu dvojsodného ve 4,5 ml tlumivého roztoku pro vyvolání zabarvení (4.2), přidat dvě kapky roztoku BQC (4.6) a nechat stát 30 minut při pokojové teplotě. Vzniklé zabarvení extrahovat 2,5 ml n-butanolu a nechat stát, dokud se butanol-1 neoddělí. Oddělit a odstranit nutanol-1. V případě nutnosti se extrakce opakuje.

Roztok je možné skladovat v chladničce několik dní; před použitím vyvolat zabarvení a provést novou extrakci. Tlumivý substrát připravit bezprostředně před použitím, a to zředěním 1 ml tohoto roztoku ve 100 ml roztoku boritanu a hydroxidu barnatého (4.1.3).

4.5 Sraženina zinek-měď

Rozpustit ve vodě 3,0 g síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,6 g síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a doplnit na 100 ml.

4.6 Roztok 2,6-dibromchinonchlorimidu (roztok BQC)

Rozpustit v 10 ml 96 % (V/V) ethanolu 40 ± 1 mg 2,6-dibromchinonchlorimidu (BQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$).

Skladovat v tmavé láhvi v chladničce. Vyhodit roztok, pokud změní barvu nebo je starší než jeden měsíc.

4.7 *Roztok síranu měďnatého (II)*

Rozpustit ve vodě 0,05 g síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a doplnit na 100 ml.

4.8 *Standardní roztok fenolu*

4.8.1 Navážit 200 ± 2 mg čistého bezvodého fenolu a přelít do odměrné baňky o objemu 100 ml, přidat vodu, promíchat a doplnit na 100 ml. Tento roztok může být skladován v chladničce několik měsíců.

4.8.2 Zředit vodou 10 ml zásobního roztoku, doplnit na 100 ml a promíchat. 1 ml obsahuje 200 μg fenolu.

5. **Přístroje a pomůcky ze skla**

Poznámky:

a) Veškeré pomůcky ze skla, jakož i zátky a přístroje pro odběr vzorků musí být pečlivě vyčištěny. Doporučuje se oplachování čerstvě převařenou destilovanou vodou nebo čistění parou.

b) Některé typy plastových zátek mohou způsobit kontaminaci fenolů a jejich používání je zakázané.

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

5.1 *Analytické váhy*

5.2 *Vodní lázeň* nastavitelná na 37 ± 1 °C.

5.3 *Spektrofotometr* vhodný pro odečty na vlnové délce 610 nm.

5.4 *Zkumavky*, 16 nebo 18×150 mm, nejlépe odstupňované po 5 ml a 10 ml.

5.5 *Pipety*

5.6 *Skleněné nálevky* vhodné velikosti, např. o průměru 5 cm.

5.7 *Skládané filtry* o průměru nejméně 9 cm pro střední rychlost filtrace.

5.8 *Odměrné baňky* pro přípravu standardních roztoků.

6. **Postup**

Poznámky:

a) Během stanovení zabránit vlivu přímého slunečního světla.

b) Stopy slin nebo potu mohou způsobit falešně pozitivní výsledky a je nutné se jim vyhnout. Je proto třeba věnovat zvláštní pozornost pipetování.

6.1 *Příprava testovacího vzorku*

6.1.1 Testování provést ihned po odběru vzorků. V opačném případě skladovat vzorek v chladničce, avšak ne déle než dva dny.

6.2 *Testovací vzorek*

Pomocí pipety vložit 1 ml vzorku do každé ze dvou zkumavek (5.4), jednu zkumavku použít jako kontrolní nebo slepý pokus.

6.3 *Stanovení*

6.3.1 Slepý vzorek zahřívat dvě minuty ve vroucí vodě; zkumavku a kádinku s vroucí vodou zakrýt hliníkovou fólií, aby se prohřála celá zkumavka. Rychle zchladit na pokojovou teplotu.

6.3.2 Po zbytek postupu ošetřovat slepý a testovací vzorek stejným způsobem. Přidat 10 ml roztoku substrátu (4.4) a promíchat.

- 6.3.3 Vzorky ihned inkubovat 60 minut ve vodní lázni (5.2) a občas (nejméně čtyřikrát) promíchat jejich obsah.
- 6.3.4 Stejně jako v bodě 6.3.1 zahřívat dvě minuty ve vroucí vodě. Rychle zchladit na pokojovou teplotu.
- 6.3.5 Do každé zkumavky přidat 1 ml sraženiny zinek-měď (4.5) a řádně promíchat.
- 6.3.6 Přefiltrovat přes suchý filtrační papír, vylít první dva mililitry a v případě nutnosti filtrovat znovu, dokud není filtrát dokonale čirý; shromáždit 5 ml ve zkumavce.
- 6.3.7 Přidat 5 ml tlumivého roztoku pro vyvolání zabarvení (4.2).
- 6.3.8 Přidat 0,1 ml roztoku BQC (4.6), promíchat a 30 minut nechat vyvíjet zabarvení při pokojové teplotě.
- 6.3.9 V porovnání s kontrolním nebo slepým pokusem změřit absorbanci při vlnové délce 610 nm.
- 6.3.10 Pokud absorbance naměřená v bodě 6.3.9 převyšuje absorbanci standardního roztoku obsahujícího 20 µg fenolu na zkumavku podle bodu 6.4.4, opakovat stanovení při vhodném zředění vzorku. Připravit zředění smícháním objemu testovacího vzorku s vhodným objemem části téhož testovacího vzorku, který se opatrně uvede do varu, aby se inaktivovala fosfatáza.
- 6.4 *Sestrojení kalibrační křivky*
- 6.4.1 Na základě standardního roztoku fenolu (4.8.2) připravit vyhovující řadu zředěných standardních roztoků obsahujících 0 (kontrolní nebo slepý pokus), 2, 5, 10 a 20 µg fenolu na mililitr. Do každé z pěti zkumavek vložit pomocí pipety 1 ml vody a 1 ml těchto standardních roztoků fenolu.
- 6.4.2 Do každé zkumavky přidat 1 ml roztoku síranu měďnatého (4.7), 5 ml tlumivého roztoku pro zředění vzniklého zabarvení (4.3), 3 ml vody a 0,1 ml roztoku BQC (4.6); promíchat.
- 6.4.3 Nechat vyvíjet zabarvení 30 minut při pokojové teplotě.
- 6.4.4 V porovnání s kontrolním nebo slepým pokusem změřit absorbanci při vlnové délce 610 nm.
- 6.4.5 Na základě hodnot absorbance (6.4.4) získaných pro každé množství přidaného fenolu (6.4.1) vypočítat regresní přímku metodou nejmenších čtverců.

7. Vyjádření výsledků

7.1 Výpočet a vzorec

- 7.1.1 Na základě hodnot absorbance (6.3.9) vypočítat množství fenolu pomocí regresní přímky (6.4.5).
- 7.1.2 Vypočítat aktivitu fosfatázy vyjádřenou v µg fenolu na mililitr pasterovaného mléka podle tohoto vzorce:

$$\text{Aktivita fosfatázy} = 2,4 \times A \times D$$

kde

A je množství fenolu v µg získané podle bodu 7.1.1;

D je faktor zředění pro zředění provedené podle bodu 6.3.10 (v případě žádného zředění D = 1).

2,4 je faktor zředění (5/12 z 1 ml testovacího vzorku) – viz 6.2 ve spojitosti s 6.3.2, 6.3.5 a 6.3.6.

7.2 Spolehlivost

- 7.2.1 Opakovatelnost (r): 2 µg fenolu/ml.
- 7.2.2 Reprodukovatelnost (R): 3 (předběžně) µg fenolu/ml.
- 7.2.3 Pokud se zředění provede podle 6.3.10, limity uvedené v 7.2.1 a 7.2.2 se týkají výsledků získaných ze zředěného vzorku.

III. STANOVENÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY

1. **Předmět a oblast použití**

Tato kapitola popisuje referenční postup pro stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti enzymu peroxidázy v mléce, který slouží ke kontrole pasterace.

2. **Definice**

Pozitivní reakce na peroxidázu:

Pokud je mléko řádně pasterováno, do 30 sekund po promíchání se objeví modré zabarvení.

Negativní reakce na peroxidázu:

Do 30 sekund po promíchání se neobjeví žádné zabarvení.

3. **Princip**

Peroxidáza rozkládá peroxid vodíku. Uvolněný atomický kyslík oxiduje bezbarvý para-fenylendiamin na purpurový indofenol (Štorchův test). Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci enzymu.

4. **Činidla**4.1 *Roztok 1,4 fenylendiaminu*

Rozpustit v teplé vodě (50 °C) 2 g 1,4 fenylendiaminu ($C_6H_8N_2$) a doplnit na 100 ml. Roztok skladovat v chladu a temnu, v tmavě hnědé lahvi se skleněnou zátkou. Během jednoho až dvou dní po připravení roztok 1,4 fenylendiaminu vytvoří usazeninu, kterou je vhodné odstranit.

4.2 *Roztok peroxidu vodíku*

Vodou zředit 9 ml 30 % peroxidu vodíku a doplnit na 100 ml. Pro stabilizaci přidat 1 ml koncentrované kyseliny sírové na litr roztoku.

Roztok peroxidu vodíku je stálý asi jeden měsíc, pokud je skladován v chladu a temnu, v láhvi se skleněnou zátkou, která zabrání jakémukoli styku s organickými látkami.

5. **Postup**

5.1 Dát 5 ml vzorku mléka do čisté zkumavky s vhodným víčkem.

5.2 Přidat 5 ml roztoku 1,4 fenylendiaminu (4.1).

5.3 Přidat 2 kapky roztoku peroxidu vodíku (4.2).

5.4 30 sekund po promíchání sledovat zabarvení. Pokud se modré zabarvení objeví více než 30 sekund po přidání činidel, reakce není specifická.

IV. STANOVENÍ OBSAHU MIKROORGANISMŮ PŘI 30 °C

1. Předmět a oblast použití

Tato kapitola popisuje referenční postup pro stanovení obsahu mikroorganismů technikou počítání kolonií při 30 °C. Postup se použije pro syrové mléko, pasterované mléko, UHT mléko nebo sterilizované mléko, které bylo 15 dní preinkubováno při 30 °C.

2. Definice

„Mikroorganismy“ se rozumějí organismy, které vytvářejí počítatelné kolonie po aerobní inkubaci za popsáných podmínek.

3. Princip

Smíchat stanovený objem vzorku mléka s kultivačním médiem v Petriho miskách a nechat inkubovat 72 hodin při 30 °C. Spočítat kolonie a vypočítat počet mikroorganismů na 1 ml syrového nebo pasterovaného mléka nebo na 0,1 ml preinkubovaného sterilizovaného mléka nebo UHT mléka.

4. Přístroje a pomůcky ze skla

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1 Přístroje

4.1.1 Horkovzdušná sušárna, nastavitelná na 170 až 175 °C.

4.1.2 Autokláv, nastavitelný na 121 ± 1 °C.

4.1.3 Inkubátor, schopný udržovat teplotu 30 ± 1 °C.

4.1.4 pH-metr se zařízením pro kompenzaci teploty, přesný na $\pm 0,1$ jednotky pH.

4.1.5 Vodní lázeň, nastavitelná na 45 ± 1 °C.

4.1.6 Zvětšovací sklo, zvětšení 2 – 4x.

4.1.7 Zvětšovací sklo, zvětšení 8 – 10x.

4.1.8 Mechanické počítadlo

4.1.9 Míchačka schopná smíchat 1 ml vzorku mléka nebo desetinného ředění s 9 ml ředicího roztoku a pracující na principu excentrické rotace obsahu zkumavky.

4.2 Pomůcky ze skla

4.2.1 Zkumavky s vhodnými uzávěry a dostatečným objemem, s dostatečným prostorem k promíchání 10 ml primárního ředění nebo dalších desetinných ředění.

4.2.2 Baňky o objemu 150 až 250 ml nebo zkumavky o objemu 20 ml pro skladování kultivačního média.

4.2.3 Pipety (utěsněné vatou), skleněné nebo ze sterilního syntetického materiálu, s nepoškozeným hrotem, o nominálním objemu 1 ml, s výpustním otvorem o průměru 1,75 až 3 mm.

4.2.4 Petriho misky z čirého, bezbarvého skla nebo sterilního syntetického materiálu, dno misek má vnitřní průměr asi 90 až 100 mm. Vnitřní hloubka misek by měla být nejméně 10 mm. Dno nesmí mít žádné nerovnosti, které by bránily počítání kolonií.

4.2.5 Sterilizace pomůcek ze skla:

Pomůcky ze skla se sterilizují jedním z těchto postupů:

a) v horkovzdušné sušárně (4.1.1), nejméně jednu hodinu při teplotě 170–175 °C;

b) v autoklávu (4.1.2), nejméně 20 minut při teplotě 121 ± 1 °C.

Při použití autoklávu je nutné dbát na to, aby bylo zajištěno dostatečné proniknutí páry: pokud se materiál sterilizuje v nádobách, tyto nádoby by neměly být napevno uzavřeny, uzávěry nebo víčka by měly být volné.

Pomůcky ze skla sterilizované v autoklávech by se měly vysušit odvětráním páry.

Pipety musí být sterilizovány v horkovzdušné sušárně (4.1.1).

5. **Kultivační médium – agar se sušeným mlékem**

5.1 *Složení:*

Kvasnicový extrakt	2,5 g
Trypton	5,0 g
D-glukóza (+) nebo dextróza	1,0 g
Sušené odstředěné mléko	1,0 g
Agar	10–15 g podle želírovacích vlastností agaru
Voda	1 000 ml

Sušené odstředěné mléko by nemělo obsahovat žádné inhibiční látky. Toto se ověří srovnávacími testy se sušeným odstředěným mlékem, které průkazně žádné inhibiční látky neobsahuje.

Příprava:

V tomto pořadí suspendovat a rozpustit ve vodě kvasnicový extrakt, trypton, glukózu a nakonec sušené odstředěné mléko. Ohřev suspenze usnadňuje postup. Poté přidat agar a za stálého míchání uvést do varu, dokud se agar zcela nerozpustí, nebo zahřívát v páře asi 30 minut.

Pokud to je nezbytné, přefiltrovat přes papír.

Zkontrolovat pH pomocí pH-metru (4.1.4); pokud to je nezbytné, upravit pH, roztokem (nejméně 0,1 mol/l) hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové, aby po sterilizaci byla jeho hodnota $6,9 \pm 0,1$ při 25 °C.

5.2 *Rozdělení, sterilizace a skladování kultivačního média*

Rozdělit médium (5.1) v množstvích od 100 do 150 ml do baněk nebo po 12 až 15 ml do zkumavek (4.2.2). Baňky a zkumavky uzavřít.

15 minut sterilizovat v autoklávu (4.1.2) při 121 ± 1 °C.

Zkontrolovat pH kultivačního média.

Pokud se kultivační médium nepoužije ihned, skladuje se v temnu při teplotě mezi 1 a 5 °C, avšak ne déle než 1 měsíc po jeho přípravě.

5.3 *Komerční dehydrované kultivační médium*

Kultivační médium (5.1) se může připravit z komerčního dehydrovaného kultivačního média. Dodržet pokyny výrobce, ale přidat sušené odstředěné mléko před rozpouštěním, pokud není složkou produktu.

Upravit pH na $6,9 \pm 0,1$ při 25 °C metodou podle bodu 5.1, poté rozdělit, sterilizovat a skladovat kultivační médium podle bodu 5.2.

6. **Ředidla**

6.1 *Roztok pepton/sůl*

Složení:

Pepton	1,0 g
Chlorid sodný (NaCl)	8,5 g
Voda	1 000 ml

Příprava:

Rozpustit složky ve vodě, pokud to je nutné, zahřívát.

Zkontrolovat pH pH-metrem (4.1.4); pokud to je nezbytné upravit pH roztokem (nejméně 0,1 mol/l) hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové, aby po sterilizaci byla jeho hodnota $7,0 \pm 0,1$ při 25 °C.

6.2 Rozdělení, sterilizace a skladování ředidla

Rozdělit ředidlo (6.1) do zkumavek (4.2.1) tak, aby po sterilizaci každá zkumavka obsahovala $9,0 \pm 0,2$ ml ředidla. Zkumavky uzavřít.

15 minut sterilizovat v autoklávu (4.1.2) při 121 ± 1 °C.

Zkontrolovat pH ředidla.

Pokud se ředidlo nepoužije ihned, skladuje se v temnu při teplotě mezi 1 a 5 °C, avšak ne déle než 1 měsíc po jeho přípravě.

6.3 Komerční dehydrovaná ředidla

Ředidlo (6.1) se může připravovat z komerčních dehydrovaných tablet nebo prášku. Dodržet pokyny výrobce. Upravit pH metodou podle bodu 6.1, poté rozdělit, sterilizovat a skladovat ředidla podle bodu 6.2.

7. Postup**7.1 Rozpouštění kultivačního média**

Před zahájením mikrobiologického vyšetření nechat rychle rozpustit potřebné množství kultivačního média a zchladit ve vodní lázni (4.1.5) na 45 ± 1 °C.

7.2 Příprava vzorku mléka

Vzorek mléka řádně promíchat, aby byly mikroorganismy co nejrovnoměrněji rozděleny, a to 25 rychlými otočeními nádoby se vzorkem. Je nutné zabránit tvorbě pěny nebo pěnu nechat rozpítlit. Doba mezi mícháním a odběrem testovacího vzorku by neměla překročit tři minuty.

7.3 Příprava primárního ředění (10^{-1}) (syrové a pasterované mléko)

Sterilní pipetou (4.2.3) přenést 1 ml vzorku (7.2) syrového nebo pasterovaného mléka do 9 ml ředidla (6.1), přičemž pipeta nesmí přijít do kontaktu s ředidlem. Teplota ředidla musí být přibližně stejná jako teplota vzorku mléka. 5 až 10 sekund opatrně promíchávat toto primární ředění míchačkou (4.1.9).

Získá se tak primární ředění 10^{-1} .

7.4 Příprava dalších desetinných ředění (syrové a pasterované mléko)

Sterilní pipetou (4.2.3) přenést 1 ml primárního ředění (7.3) do 9 ml ředidla (6.1) podle pokynů v bodě 7.3.

Získá se tak ředění 10^{-2} .

S cílem získat další desetinná ředění se tento postup opakuje tak dlouho, dokud nelze očekávat přiměřené množství mikroorganismů (8.1.1).

7.5 Naočkování Petriho misek

7.5.1 Syrové mléko: Sterilní pipetou (4.2.3) přenést do misky (4.2.4) 1 ml vzorku a/nebo vhodného desetinného ředění. Musí být vyšetřena nejméně dvě ředění. Pro každé ředění (8.1.1) připravit jednu vhodnou misku.

7.5.2 Pasterované mléko: Sterilní pipetou (4.2.3) přenést do misky (4.2.4) 1 ml vzorku a/nebo vhodného desetinného ředění. Musí být vyšetřena nejméně dvě ředění. Pro každé ředění (8.1.1) připravit jednu vhodnou misku.

7.5.3 UHT mléko a sterilizované mléko (vyšetřované po 15 denní inkubaci při 30 °C – směrnice 85/397/EHS, příloha A kapitola VII bod 5):

Sterilní pipetou (4.2.3) přenést do misky (4.2.4) 1 ml vzorku mléka (7.2). Připravit dvě misky.

7.6 *Nalévání kultivačního média*

Do každé naočkované misky nalít asi 15 až 18 ml kultivačního média (7.1).

Okamžitě promíchat rotací Petriho misky, aby po inkubaci došlo k rovnoměrnému rozložení kolonií.

Doba mezi koncem přípravy vzorku mléka a smícháním, podle druhu mléka, testovacího vzorku nebo ředění s kultivačním médiem nesmí překročit 15 minut.

Nechat stát na vodorovném, chladném a čistém povrchu, dokud médium neztuhne.

7.7 *Inkubace Petriho misek*

Přenést misky do inkubátoru (4.1.3). Misky inkubovat obrácené dnem nahoru. Neskládat na sebe více než šest misek. Sloupky misek se nesmějí vzájemně dotýkat, ani být v kontaktu se stěnami a vrchní částí inkubátoru.

Inkubovat 72 ± 2 hodin při 30 ± 1 °C.

7.8 *Počítání kolonií*

Počítat kolonie v Petriho miskách neobsahujících více než 300 kolonií.

Misky vyšetřit při tlumeném světle. Pro usnadnění počítání lze použít zvětšovací sklo (4.1.6) a/nebo mechanické počítadlo (4.1.8). Je nutné dbát na to, aby nedošlo k záměně částic sraženin v miskách s drobnými bodovými koloniemi. V případě pochybností provést pečlivý průzkum pomocí zvětšovacího skla s větším zvětšením (4.1.7), s cílem odlišit kolonie od cizích částic.

Kolonie tvořící povlak se považují za jednu kolonii. Pokud kolonie tvořící povlak pokrývají méně než čtvrtinu misky, spočítat kolonie v nepoškozené části misky a vypočítat odpovídající počet pro celou misku. Pokud kolonie tvořící povlak pokrývají více než čtvrtinu plochy misky, misku vyřadit.

8. **Výpočet a vyjádření výsledků**8.1 *Syrové a pasterované mléko*

8.1.1 Použít výsledky misek obsahujících 10 až 300 kolonií (viz 8.1.3 a 8.1.4).

8.1.2 Vypočítat počet mikroorganismů na 1 ml syrového nebo pasterovaného mléka podle tohoto vzorce:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

kde:

$\sum C$ ΣC je celkový počet kolonií podle bodu 8.1.1.

$(n_1 + 0,1n_2)d$ je objem naočkovaného vzorku, kde:

n_1 je počet misek při prvním ředění

n_2 je počet misek při druhém ředění

d je faktor zředění, na základě kterého byly získány první počty.

Počet se zaokrouhlí na dvě platné číslice. Když je zaokrouhlovaná číslice pět, zaokrouhlit tak, aby sousední číslice vlevo byla sudá.

Příklad (pasterované mléko):

Ředění 10^{-2} : 278 a 290 kolonií

Ředění 10^{-3} : 33 a 28 kolonií

$$\text{Počet/ml:} = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$$

$$= 28\,590$$

$$= 29\,000$$

$$= 2,9 \times 10^4.$$

- V8.1.3 Pokud jsou všechny počty nižší než 10, uvést, že počet mikroorganismů na mililitr je „nižší než 10 x d“, přičemž „d“ je převrácená hodnota nejnižšího faktoru zředění.
- 8.1.4 Pokud jsou všechny počty vyšší než 300 a počítání je možné, provést odhad a vynásobit jej převrácenou hodnotou faktoru zředění. Výsledek vyjádřit jako „Odhadovaný počet mikroorganismů na ml“.
- 8.2 *UHT mléko a sterilizované mléko*
Počty vyšší než 10 kolonií na 0,1 ml se považují za nevyhovující požadavkům směrnice 85/397/EHS.
9. **Spolehlivost**
Výsledky mezinárodně uznaných kruhových testů ještě nejsou k dispozici.

V. STANOVENÍ OBSAHU MIKROORGANISMŮ PŘI 21 °C**1. Předmět a oblast použití**

Tato kapitola popisuje referenční postup pro stanovení obsahu mikroorganismů technikou počítání kolonií při 21 °C v pasterovaném mléce, které bylo pět dní preinkubováno při 6 °C s cílem stanovit stupeň kontaminace pasterovaného mléka psychotropními mikroorganismy, které se umí množit se v mléce při 6 °C.

2. Definice

„Mikroorganismy“ se rozumějí organismy, které vytvářejí počítatelné kolonie po aerobní inkubaci za popsaných podmínek.

3. Princip

Inkubovat pasterované mléko pět dní při 6 °C. Smíchat stanovený objem vzorku mléka s kultivačním médiem v Petriho miskách a nechat inkubovat 25 hodin při 21 °C. Spočítat kolonie a vypočítat počet mikroorganismů na 1 ml pasterovaného mléka.

4. Přístroje a pomůcky ze skla

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1 Přístroje

4.1.1 Horkovzdušná sušárna, nastavitelná na 170 až 175 °C.

4.1.2 Autokláv, nastavitelný na 121 ± 1 °C.

4.1.3 Inkubátor, schopný udržovat teplotu:

a) $6 \pm 0,2$ °C

b) 21 ± 1 °C

ve všech bodech uvnitř.

4.1.4 pH-metr se zařízením pro kompenzaci teploty, přesný na $\pm 0,1$ jednotky pH.

4.1.5 Vodní lázeň, nastavitelná na 45 ± 1 °C.

4.1.6 Zvětšovací sklo, zvětšení 2 – 4x.

4.1.7 Zvětšovací sklo, zvětšení 8 – 10x.

4.1.8 Mechanické počítadlo

4.1.9 Míchačka schopná rozmíchat 1 ml vzorku mléka nebo desetinného ředění s 9 ml ředícího roztoku a pracující na principu excentrické rotace obsahu zkumavky.

4.2 Pomůcky ze skla

4.2.1 Zkumavky s vhodnými uzávěry a dostatečným objemem, s dostatečným prostorem k promíchání 10 ml primárního ředění nebo dalších desetinných ředění.

4.2.2 Baňky o objemu 150 až 250 ml nebo zkumavky o objemu 20 ml pro skladování kultivačního média.

4.2.3 Pipety (utěsněné vatou), skleněné nebo ze sterilního syntetického materiálu, s nepoškozeným hrotem, o nominálním objemu 1 ml, s výpustním otvorem o průměru 1,75 až 3 mm.

4.2.4 Petriho misky z čirého, bezbarvého skla nebo ze sterilního syntetického materiálu, dno misek má vnitřní průměr asi 90 až 100 mm. Vnitřní hloubka misky by měla být nejméně 10 mm. Dno nesmí mít žádné nerovnosti, které by bránily počítání kolonií.

4.2.5 Sterilizace pomůcek ze skla:

Pomůcky ze skla se sterilizují jedním z těchto postupů:

a) v horkovzdušné sušárně (4.1.1), nejméně jednu hodinu při teplotě 170–175 °C;

b) v autoklávu (4.1.2), nejméně 20 minut při teplotě 121 ± 1 °C.

Při použití autoklávu je nutné dbát na to, aby bylo zajištěno dostatečné proniknutí páry: pokud se materiál sterilizuje v nádobách, tyto nádoby by neměly být napevno uzavřeny, uzávěry nebo víčka by měly být volné.

Pomůcky ze skla sterilizované v autoklávech by se měly vysušit odvětráním páry.

Pipety musí být sterilizovány v horkovzdušné sušárně (4.1.1).

5. **Kultivační médium – agar se sušeným mlékem**

5.1 *Složení:*

Kvasnicový extrakt	2,5 g
Trypton	5,0 g
D-glukóza(+) nebo dextróza	1,0 g
Sušené odstředěné mléko	1,0 g
Agar	10-15 g podle želírovacích vlastností agaru
Voda	1 000 ml

Sušené odstředěné mléko by nemělo obsahovat žádné inhibiční látky. Toto se ověří srovnávacími testy se sušeným odstředěným mlékem, které průkazně žádné inhibiční látky neobsahuje.

Příprava:

V tomto pořadí suspendovat a rozpustit ve vodě kvasnicový extrakt, trypton, glukózu a nakonec sušené odstředěné mléko. Ohřev suspenze usnadňuje postup. Poté přidat agar a uvést do varu za stálého míchání, dokud se agar zcela nerozpustí, nebo zahřívát v páře asi 30 minut.

Pokud je to nezbytné, přefiltrovat přes papír.

Zkontrolovat pH pomocí pH-metru (4.1.4); pokud to je nezbytné, upravit pH, roztokem (nejméně 0,1 mol/l) hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové, aby po sterilizaci byla jeho hodnota $6,9 \pm 0,1$ při 25 °C.

5.2 *Rozdělení, sterilizace a skladování kultivačního média*

Rozdělit médium (5.1) v množstvích od 100 do 150 ml do baněk nebo po 12 až 15 ml do zkumavek (4.2.2). Baňky a zkumavky uzavřít.

15 minut sterilizovat v autoklávu (4.1.2) při 121 ± 1 °C.

Zkontrolovat pH kultivačního média.

Pokud se kultivační médium nepoužije ihned, skladuje se v temnu při teplotě mezi 1 a 5 °C, avšak ne déle než 1 měsíc po jeho přípravě.

5.3 *Komerční dehydrované kultivační médium*

Kultivační médium (5.1) se může připravit z komerčního dehydrovaného kultivačního média. Dodržet pokyny výrobce, ale přidat sušené odstředěné mléko před rozpouštěním, pokud není složkou produktu.

Upravit pH na $6,9 \pm 0,1$ při 25 °C postupem podle bodu 5.1, poté rozdělit, sterilizovat a skladovat kultivační médium podle bodu 5.2.

6. **Ředidla**

6.1 *Roztok pepton/sůl*

Složení:

Pepton	1,0 g
Chlorid sodný (NaCl)	8,5 g
Voda	1 000 ml

Příprava:

Rozpustit složky ve vodě, pokud to je nutné, zahřívát.

Zkontrolovat pH pH-metrem (4.1.4); pokud to je nezbytné upravit pH roztokem (nejméně 0,1 mol/l) hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové, aby po sterilaci byla jeho hodnota $7,0 \pm 0,1$ při 25 °C.

6.2 Rozdělení, sterilizace a skladování ředidla

Rozdělit ředidlo (6.1) do zkumavek (4.2.1) tak, aby po sterilizaci každá zkumavka obsahovala $9,0 \pm 0,2$ ml ředidla. Zkumavky uzavřít.

15 minut sterilizovat v autoklávu (4.1.2) při 121 ± 1 °C. Zkontrolovat pH ředidla.

Pokud se ředidlo nepoužije ihned, skladuje se v temnu při teplotě mezi 1 a 5 °C, avšak ne déle než 1 měsíc po jeho přípravě.

6.3 Komerční dehydrovaná ředidla

Ředidlo (6.1) se může připravovat z komerčních dehydrovaných tablet nebo prášku. Dodržet pokyny výrobce. Upravit pH postupem podle bodu 6.1, poté rozdělit, sterilizovat a skladovat ředidla podle bodu 6.2.

7. Postup**7.1 Rozpuštění kultivačního média**

Před zahájením mikrobiologického vyšetření nechat rychle rozpustit potřebné množství kultivačního média a zchladit ve vodní lázni (4.1.5) na 45 ± 1 °C.

7.2 Příprava vzorku mléka**7.2.1 Inkubovat v inkubátoru [4.1.3 a)] uzavřené balení pasterovaného mléka nebo, pokud to není možné, reprezentativní vzorek o objemu nejméně 100 ml po dobu 120 ± 2 hodin při $6 \pm 0,5$ °C.****7.2.2 Po inkubaci vzorek mléka řádně promíchat, aby byly mikroorganismy co nejrovnoměrněji rozděleny, a to 25 rychlými otočeními nádoby se vzorkem. Je nutné zabránit tvorbě pěny nebo pěny nechat rozptýlit. Doba mezi mícháním a odběrem testovacího vzorku by neměla překročit tři minuty.****7.3 Příprava primárního ředění (10^{-1})**

Sterilní pipetou (4.2.3) přenést 1 ml vzorku (7.2) syrového nebo pasterovaného mléka do 9 ml ředidla (6.1), přičemž pipeta nesmí přijít do kontaktu s ředidlem. Teplota ředidla musí být přibližně stejná jako teplota vzorku mléka. 5 až 10 sekund opatrně promíchávat toto primární ředění míchačkou (4.1.9).

Získá se tak primární ředění 10^{-1} .

7.4 Příprava dalších desetinných ředění

Sterilní pipetou (4.2.3) přenést 1 ml primárního ředění (7.3) do 9 ml ředidla (6.1) podle pokynů v bodě 7.3.

Získá se tak ředění 10^{-2} .

S cílem získat další desetinná ředění se tento postup opakuje tak dlouho, dokud nelze očekávat přiměřené množství mikroorganismů (8.1.1).

7.5 Naočkování Petriho misek

Sterilní pipetou (4.2.3) přenést do misky (4.2.4) 1 ml vzorku a/nebo vhodného desetinného ředění. Musí být vyšetřena nejméně dvě ředění. Pro každé ředění (8.1.1) připravit jednu vhodnou misku.

7.6 Nalévání kultivačního média

Do každé naočkované misky nalít asi 15 až 18 ml kultivačního média (7.1).

Ihned promíchat rotací Petriho misky, aby po inkubaci došlo k rovnoměrnému rozložení kolonií.

Doba mezi koncem přípravy vzorku mléka a smícháním, podle druhu mléka, testovacího vzorku nebo ředění s kultivačním médiem nesmí překročit 15 minut.

Nechat stát na vodorovném, chladném a čistém povrchu, dokud médium neztuhne.

7.7 *Inkubace Petriho misek*

Přenést misky do inkubátoru (4.1.3). Misky inkubovat obrácené dnem nahoru. Neskládat na sebe více než šest misek. Sloupky misek se nesmějí vzájemně dotýkat, ani být v kontaktu se stěnami a vrchní částí inkubátoru.

Inkubovat 25 hodin při 21 ± 1 °C.

7.8 *Počítání kolonií*

Počítat kolonie v Petriho miskách neobsahujících více než 300 kolonií.

Misky vyšetřit při tlumeném světle. Pro usnadnění počítání lze použít zvětšovací sklo (4.1.6) a/nebo mechanické počítadlo (4.1.8). Je nutné dbát na to, aby nedošlo k záměně částic sraženin v miskách s drobnými bodovými koloniemi. V případě pochybností provést pečlivý průzkum pomocí zvětšovacího skla s větším zvětšením (4.1.7), s cílem odlišit kolonie od cizích částic.

Kolonie tvořící povlak se považují za jednu kolonii. Pokud kolonie tvořící povlak pokrývají méně než čtvrtinu misky, spočítat kolonie v nepostižené části misky a vypočítat odpovídající počet pro celou misku. Pokud kolonie tvořící povlak pokrývají více než čtvrtinu plochy misky, misku vyřadit.

8. **Výpočet a vyjádření výsledků**

8.1 Použít výsledky misek obsahujících 10 až 300 kolonií (viz 8.1.3 a 8.1.4).

8.2 Vypočítat počet mikroorganismů na 1 ml syrového nebo pasterovaného mléka podle tohoto vzorce:

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

kde:

ΣC je celkový počet kolonií podle bodu 8.1,

$(n_1 + 0,1 n_2)d$ je objem naočkovaného vzorku, kde:

n_1 je počet misek při prvním ředění

n_2 je počet misek při druhém ředění

d je faktor zředění, na základě kterého byly získány první počty.

Počet se zaokrouhlí na dvě platné číslice. Když je zaokrouhlována číslice pět, zaokrouhlit tak, aby sousední číslice vlevo byla sudá.

Příklad:

Ředění 10^{-2} : 278 a 290 kolonií

Ředění 10^{-3} : 33 a 28 kolonií

$$\begin{aligned} \text{Počet/ml: } &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

8.3 Pokud jsou všechny počty nižší než 10, uvést, že počet mikroorganismů na mililitr je „nižší než $10 \times d$ “, přičemž „ d “ je převrácená hodnota nejnižšího faktoru zředění.

8.4 Pokud jsou všechny počty vyšší než 300 a počítání je možné, provést odhad a vynásobit jej převrácenou hodnotou faktoru zředění. Výsledek vyjádřit jako „Odhadovaný počet mikroorganismů na ml“.

9. **Spolehlivost**

Výsledky mezinárodně uznávaných kruhových testů ještě nejsou k dispozici.

VI. STANOVENÍ OBSAHU KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ – POČÍTÁNÍ KOLONIÍ PŘI 30 °C**1. Předmět a oblast použití**

Tato kapitola popisuje referenční postup pro stanovení koliformních bakterií v pasterovaném mléce technikou počítání kolonií při 30 °C.

2. Definice

„Koliformními bakteriemi“ se rozumějí bakterie, které při 30 °C vytvářejí charakteristické kolonie nebo necharakteristické kolonie, jež jsou za popsáných podmínek schopné zkvašovat s tvorbou plynu.

3. Princip

Smíchat stanovený objem vzorku mléka s kultivačním médiem v Petriho miskách a 24 hodin nechat inkubovat při 30 °C. Spočítat charakteristické kolonie a, pokud to je nutné, potvrdit identitu necharakteristických kolonií otestováním jejich schopnosti zkvašovat laktózu. Poté vypočítat počet koliformních bakterií na 1 ml pasterovaného mléka.

4. Přístroje a pomůcky ze skla

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1 Přístroje

4.1.1 Horkovzdušná sušárna, nastavitelná na 170 až 175 °C.

4.1.2 Autokláv, nastavitelný na 121 ± 1 °C.

4.1.3 Inkubátor, schopný udržovat teplotu 30 ± 1 °C.

4.1.4 pH-metr se zařízením pro kompenzaci teploty, přesný na $\pm 0,1$ jednotky pH.

4.1.5 Vodní lázeň, nastavitelná na 45 ± 1 °C.

4.1.6 Očkovací jehla ze slitiny platina-iridium nebo nikl-chróm.

4.2 Pomůcky ze skla

4.2.1 Zkumavky s vhodnými uzávěry a objemem 20 ml, aby mohly obsahovat konfirmační kultivační médium (5.2) a Durhamovy trubičky vhodné velikosti.

4.2.2 Baňky o objemu 150 až 250 ml pro skladování sušeného selektivního kultivačního média (5.1).

4.2.3 Pipety (utěsněné vatou), skleněné nebo ze sterilního syntetického materiálu, s nepoškozeným hrotem, o nominálním objemu 1 – 10 ml, s výpustním otvorem o průměru 1,75 až 3 mm.

4.2.4 Petriho misky z čirého, bezbarvého skla nebo ze sterilního syntetického materiálu, dno misek má vnitřní průměr asi 90 až 100 mm. Vnitřní hloubka misky by měla být nejméně 10 mm. Dno nesmí mít žádné nerovnosti, které by bránily počítání kolonií.

4.2.5 Sterilizace pomůcek ze skla:

Pomůcky ze skla se sterilizují jedním z těchto postupů:

a) v horkovzdušné sušárně (4.1.1), nejméně jednu hodinu při teplotě 170 – 175 °C;

b) v autoklávu (4.1.2), nejméně 20 minut při teplotě 121 ± 1 °C.

Při použití autoklávu je nutné dbát na to, aby bylo zajištěno dostatečné proniknutí páry: pokud se materiál sterilizuje v nádobách, tyto nádoby by neměly být napevno uzavřeny, uzávěry nebo víčka by měly být volné.

Pomůcky ze skla sterilizované v autoklávech by se měly vysušit odvětráním páry.

Pipety musí být sterilizovány v horkovzdušné sušárně (4.1.1).

5. Kultivační médium

- 5.1 Agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a laktózou (VRBL agar). Sušené selektivní médium.

Složení:

Pepton	7 g
Kvasnicový extrakt	3 g
Laktóza ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Chlorid sodný (NaCl)	5 g
Žlučové soli	1,5 g
Neutrální červení	0,03 g
Krystalová violet	0,002 g
Agar	10 až 15 g podle želírovacích vlastností agaru
Voda	1 000 ml

Příprava:

Suspendovat a rozpustit složky ve vodě a nechat stát několik minut. Poté důkladně promíchat.

Zkontrolovat pH pomocí pH-metru (4.1.4); pokud to je nutné, upravit pH roztokem (nejméně 0,1 mol/l) hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové, aby po varu byla jeho hodnota $7,4 \pm 0,1$ při 25 °C.

Uvést rychle do varu za občasného protřepávání a ihned rozlít po množstvích 100 až 150 ml do sterilních baněk (4.2.2). Kultivační médium zchladit ve vodní lázni (4.1.5) na 45 ± 1 °C.

V době použití zkontrolovat sterilitu kultivačního média (6.4).

Použít kultivační médium do tří hodin po jeho přípravě.

- 5.2 Tekutý agar s brilantovou zelení. Konfirmační kultivační médium.

Složení:

Pepton	10 g
Laktóza ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Dehydrovaná hovězí žluč	20 g
Brilantová zeleň	0,0133 g
Voda	1 000 ml

Příprava:

Rozpustit složky ve vodě a uvést do varu.

Zkontrolovat pH pomocí pH-metru (4.1.4); pokud to je nezbytné, upravit pH roztokem (nejméně 0,1 mol/l) hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové, aby po sterilizaci byla jeho hodnota $7,2 \pm 0,1$ při 25 °C.

Rozdělit médium po 10 ml do zkumavek (4.2.1) obsahujících Durhamovy trubičky. Zkumavky uzavřít.

15 minut sterilizovat v autoklávu (4.1.2) při 121 ± 1 °C.

Durhamovy trubičky nesmějí po sterilizaci obsahovat vzduchové bubliny.

Zkontrolovat pH kultivačního média.

Pokud se kultivační médium nepoužije ihned, skladuje se v temnu při teplotě mezi 1 a 5 °C, avšak ne déle než 1 měsíc po jeho přípravě.

- 5.3 Komerční dehydrované kultivační médium

Kultivační médium (5.1) se může připravit z komerčního dehydrovaného kultivačního média. Dodržte pokyny výrobce. Upravit pH, rozdělit, sterilizovat a skladovat kultivační médium podle bodů 5.1 a 5.2.

6. Postup

- 6.1 Kultivační médium

Použít médium (VRBL agar) popsané v bodě 5.1.

6.2 Příprava vzorku mléka

Vzorek mléka řádně promíchat, aby byly mikroorganismy co nejrovnoměrněji rozděleny, a to 25 rychlými otočeními nádoby se vzorkem. Je nutné zabránit tvorbě pěny nebo pěnu nechat rozptýlit. Doba mezi mícháním a odběrem testovacího vzorku by neměla překročit tři minuty.

6.3 Naočkování Petriho misek

Sterilní pipetou přenést (4.2.3) 1 ml vzorku mléka do každé ze tří misek (4.2.4) a tím naočkovat 3 ml vzorku mléka (6.2).

6.4 Nalévání kultivačního média

Do každé naočkované misky nalít asi 12 ml VRBL agaru (6.1)

Ihned po nalití řádně promíchat rotací Petriho misky, aby po inkubaci došlo k rovnoměrnému rozložení kolonií.

Doba mezi koncem přípravy vzorku mléka a smícháním s kultivačním médiem nesmí překročit 15 minut.

Za účelem kontroly sterility připravit nenačkovanou misku s 12 ml téhož VRBL agaru, který byl použit při naočkování misky.

Nechat stát na vodorovném, chladném a čistém povrchu, dokud médium neztuhne.

Po úplném ztuhnutí nalít nejméně 4 ml VRBL agaru (6.1) na povrch naočkovaného média.

Nechat ztuhnout.

6.5 Inkubace Petriho misek

Přenést misky do inkubátoru (4.1.3). Misky inkubovat obrácené dnem nahoru. Neskládat na sebe více než šest misek. Sloupky misek se nesmějí vzájemně dotýkat, ani být v kontaktu se stěnami a vrchní částí inkubátoru.

Inkubovat 24 ± 2 hodiny při 30 ± 1 °C.

6.6 Počítání kolonií

6.6.1 Počítat kolonie v Petriho miskách neobsahujících více než 150 kolonií. Počítat tmavě červené kolonie o průměru nejméně 0,5 mm, s nebo bez sraženiny kolem, charakteristické pro koliformní bakterie.

6.6.2 Pokud mají všechny nebo některé kolonie necharakteristický znak (např. jinou barvu, velikost nebo jiný tvar sraženin vzhledem k charakteristickým koloniím), provést konfirmační test (6.7).

6.7 Konfirmační test

Podle údajů v bodě 6.6.2 provést konfirmační test u vhodného počtu (např. 3 až 5) necharakteristických kolonií tím, že se pomocí očkovací jehly (4.1.6), naočkují zkumavky obsahující *tekutý agar s brilantovou zelení* (5.2). Inkubovat zkumavky 24 ± 2 hodin při 30 ± 1 °C.

Za kolonie koliformních bakterií se považují takové kolonie, které v Durhamově trubičce tvoří plyn.

7. Výpočet a vyjádření výsledků

7.1 Použít výsledky misek obsahujících maximálně 150 kolonií.

7.2 Pokud se provede konfirmační test, vypočítat počet kolonií koliformních bakterií na základě procentuálního podílu potvrzených kolonií koliformních bakterií.

7.3 Vypočítat počet koliformních bakterií na 1 ml pasterovaného mléka podle tohoto vzorce:

$$\frac{\Sigma C}{n}$$

kde:

ΣC je celkový počet kolonií koliformních bakterií (7.1 v souvislosti se 7.2), stanovených vyšetřením vzorku mléka (6.3).

n je množství vyšetřovaného vzorku (6.3) v mililitrech (3 ml).

Počet se zaokrouhlí na dvě platné číslice, pokud existuje více než 100 kolonií. Když je zaokrouhlována číslice pět, zaokrouhlit tak, aby sousední číslice vlevo byla sudá.

Pokud jsou všechny počty vyšší než 150 kolonií, uvést výsledek jako „odhadovaný počet koliformních bakterií na 1 ml“.

8. **Spolehlivost**

Výsledky mezinárodně uznaných kruhových testů ještě nejsou k dispozici.

VII. STANOVENÍ OBSAHU SOMATICKÝCH BUNĚK

Tato kapitola popisuje dva referenční postupy pro stanovení somatických buněk.

A. Mikroskopická metoda

B. Fluoro-opto-elektronická metoda

A. Mikroskopická metoda

1. Předmět a oblast použití

Tento postup popisuje referenční postup pro stanovení počtu somatických buněk v syrovém mléce.

Tento postup popisuje postup pro stanovení počtu buněk ve vzorku mléka za účelem kalibrace a kontroly správnosti fluoro-opto-elektronické metody (viz B.1).

2. Definice

Pro tento postup se somatickými buňkami rozumějí buňky, například leukocyty a epitelové buňky, jejichž jádra je možné zřetelně zbarvit methylenovou modří

3. Princip

Nanést 0,01 ml mléka na 1 cm² povrchu podložního sklíčka. Tenká vrstva se vysuší a nabarví. Počítání se provede pod mikroskopem. Počet somatických buněk spočítaných na daném povrchu se vynásobí pracovním faktorem, s cílem získat počet buněk na 1 mililitr.

4. Činidla

Musí se použít chemikálie čistoty p.a..

Barvicí roztok

Složení

Methylenová modř	0,6 g
Ethanol – 99 %	54 ml
1,1,1-trichlorethan nebo tetrachlorethan	40 ml
Ledová kyselina octová	6 ml

Upozornění

Tetrachlorethan je jedovatý. Příprava a používání se proto musí uskutečnit v digestoři.

Příprava:

Smíchat v baňce ethanol a 1,1,1-trichlorethan nebo tetrachlorethan a zahřát ve vodní lázni na 60 až 70 °C. Přidat methylenovou modř, řádně promíchat, 12 až 24 hodin chladit v chladničce při 4 °C a přidat ledovou kyselinu octovou. Přefiltrovat přes filtr o maximální velikosti pórů 10 až 12 mikronů a uchovat barvicí roztok ve vzduchotěsně uzavřené láhvi. V případě vytvoření částic nebo usazenin, před použitím roztok znovu přefiltrovat.

5. Přístroje a pomůcky ze skla

5.1 Mikroskop umožňující zvětšení 500 × až 1 000 ×

5.2 Mikrostřikačka umožňující dávkování po 0,01 ml s přesností nejméně ± 2 %.

- 5.3 Podložní sklíčko s plochou 20 mm × 5 mm vyznačenou pro tenkou vrstvu nebo standardní podložní sklíčko a šablona 20 × 5 mm pro tenkou vrstvu.
- 5.4 Horizontální topná deska (30 ° až 50 °C) pro sušení podložních sklíček.
- 5.5 Ventilátor (fén) pro sušení tenké vrstvy.
- 5.6 Vodní lázeň, nastavitelná na 30 až 40 °C pro ohřívání vzorku mléka.
- 5.7 Podložní sklíčko s mikrometrickou stupnicí po 0,01 mm.

6. Postup

6.1 Vzorek mléka

Vzorek mléka musí být testován do šesti hodin po odběru vzorku. Během skladování nesmí teplota vzorku překročit 6 °C. Vzorek nesmí být zmražen.

6.2 Příprava vzorku v laboratoři

Zahřát vzorek ve vodní lázni (5.6) na 30 až 40 °C. Poté řádně promíchat. Zchladit na teplotu, při které byla kalibrována mikrostříkačka (5.2), například 20 °C.

6.3 Předběžné ošetření podložních sklíček

Vyčistit podložní sklíčka (5.3) například ethanolem, vysušit papírem, který nezanechává prach, ožehnout plamenem a zchladit. Skladovat v krabici, kde jsou chráněna před prachem.

6.4 Příprava tenké vrstvy

Mikrostříkačkou (5.2) odebrat 0,01 ml mléka ze vzorku připraveného, jak je uvedeno výše. Pečlivě očistit vnější stranu stříkačky, která přišla do styku s mlékem. Přiložit stříkačku na podložní sklíčko (5.3) a nejprve obkreslit obvod obdélníku (20 mm × 5 mm). Poté ji co nejrovnoměrněji vyplnit. Nechat schnout tenkou vrstvu na horizontální vyhřívací desce (5.4) až do úplného vysušení.

U každého vzorku mléka připravit a vyšetřit nejméně dvě tenké vrstvy.

6.5 Barvení tenkých vrstev

Ponořit na 10 minut do barvicího roztoku (4). Sušit a, pokud je to nezbytné, vysoušení dokončit ventilátorem (5.5). Ponořit tenké vrstvy do tekoucí vody, dokud se přebytečné barvivo zcela nesmyje. Znovu sušit a uchovat tak, aby byl chráněn před prachem.

6.6 Kalibrace mikroskopického pole

Na základě zvoleného zvětšení (500 × až 1 000 ×) změřit průměr mikroskopického pole (5.7).

7. Počítání a výpočet

7.1 Počítání buněk

Použít mikroskop (5.1). Místo počítání buněk se počítají pouze buněčná jádra, a to taková jádra, která jsou jasně rozeznatelná a z nichž je v mikroskopickém poli viditelná nejméně polovina. Počítat pásy nebo pole ve střední třetině tenké vrstvy a nepočítat ty pásy nebo pole, které byly vybrány pouze z okrajových částí tenké vrstvy. Pečlivá příprava tenkých vrstev a tudíž i spolehlivost výsledků musí být kontrolovány nejméně jednou za měsíc spočítáním různých částí tenké vrstvy. Počítání lze také provádět spočítáním mikroskopických polí rozmístěných takovým způsobem, aby všechny části tenké vrstvy byly zastoupeny rovnoměrně.

7.2 Stanovení minimálního počtu buněk, které se mají počítat

Vzhledem k tomu, že počítání somatických buněk pod mikroskopem může být rovněž použito pro standardizaci automatických a mechanických postupů počítání, variační koeficient počítání z identických vzorků nesmí být vyšší než variační koeficient elektronického přístroje. Variační koeficient pro vzorek mléka s obsahem 400 000 až 600 000 buněk/ml by neměl překročit 5 %.

Počet somatických buněk, které je nutno v každém vzorku spočítat, musí být podle Poissonova zákona rozdělení nejméně 400, aby bylo splněno kritérium opakovatelnosti.

Podle Poissonova rozdělení:

$$M = V = s^2,$$

kde:

M je střední hodnota

V je rozptyl

a

s je směrodatná odchylka.

Variační koeficient je:

$$CV = \frac{s \times 100 \%}{M} \text{ nebo } CV = \frac{100 \%}{s} \text{ nebo } CV = \frac{100 \%}{\sqrt{M}}$$

M (průměr) představuje počet částic (buněk), které byly spočítány (například 400 pro CV = 5 %).

7.3 Výpočet pracovního faktoru

Při použití 0,01 ml mléka se pracovní faktor vypočítá podle bodu 7.3.1 nebo 7.3.2.

7.3.1 Počítání pásů na tenké vrstvě

Délka pásů, které se mají počítat, je 5 mm. Šířka pásu odpovídá průměru mikroskopického pole, jak je stanoven podložním sklíčkem s mikrometrickou stupnicí (5.7).

$$\text{Pracovní faktor} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

kde:

d je průměr mikroskopického pole v mm, stanovený podložním sklíčkem s mikrometrickou stupnicí (5.7)

b celkový počet spočítaných pásů.

7.3.2 Počítání mikroskopických polí ve střední třetině tenké vrstvy nebo pomocí mřížky

$$\text{Pracovní faktor} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\Pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12732}{d^2 \times s}$$

kde:

d je průměr mikroskopického pole v mm, stanovený podložním sklíčkem s mikrometrickou stupnicí (5.7)

s celkový počet spočítaných polí.

7.4 Výpočet obsahu buněk

S cílem získat počet buněk na ml mléka, se počet napočítaných somatických buněk (7.1 a 7.2) vynásobí pracovním faktorem (7.3).

7.5 Přesnost

Variační koeficient (viz 7.2) nesmí překročit 5 %.

Výsledky mezinárodně uznaných kruhových testů nejsou k dispozici.

B. Fluoro-opto-elektronická metoda

1. Předmět a oblast použití

Tento postup popisuje referenční postup, který se může po odpovídající kalibraci (viz A.1) používat pro stanovení počtu somatických buněk v syrovém mléce s chemickou konzervací nebo bez chemické konzervace.

2. Definice

Pro tento postup se somatickými buňkami rozumějí částice, které mají v důsledku barvení buněčné DNA minimální intenzitu fluorescence.

3. Princip

Část vzorku (například 0,2 ml) se důkladně promíchá s tlumivým roztokem a s fluorescenčním roztokem. Část této směsi se poté přenese ve formě tenké vrstvy na rotační disk, který slouží jako podložní sklíčko.

Každá buňka produkuje elektrický impuls, který se zesiluje a zaznamenává. Obsah somatických buněk se vytiskne v tisících na mililitr.

4. Činidla

Pokud není stanoveno jinak, musí se použít činidla čistoty p.a.. Použitá voda je destilovaná nebo deionizovaná, nebo je to voda odpovídající čistoty.

4.1 Tlumivý roztok

Složení

Hydrogenftalat draselný	51,00 g
Hydroxid draselný	13,75 g
Polyethylenglykol-mono-p(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether(například Triton X-100), 1 % objemové	10 ml
pH 5,7 až 5,9. Doplnit vodou na 10 000 ml.	

Příprava:

Smíchat jednotlivé složky. Skladování ve vzduchotěsně uzavřené nádobě by nemělo překročit sedm dní.

4.2 Fluorescenční roztok (zásobní roztok)

Složení

Ethidiumbromid	1,0 g
----------------	-------

Doplnit vodou na 1 000 ml.

Příprava:

Rozpustit ethidiumbromid ve vodě. Skladování ve vzduchotěsně uzavřené nádobě chráněné před světlem by nemělo překročit dva měsíce.

4.3 Fluorescenční roztok (pracovní roztok)

Smíchat 20 ml zásobního roztoku (4.2) s tlumivým roztokem (4.1) tak, aby se získal objem 1 000 ml. Pracovní roztok by neměl být používán více než sedm dní.

4.4 Čistící roztok

Složení

Tlumivý roztok (4.1)	10 ml
Polyethylenglykol-mono-p(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether (například Triton X-100), 1 % objemové	10 ml
Amoniak o 25 % objemových	25 ml

Doplnit vodou na 10 000 ml

Příprava:

Smíchat jednotlivé složky. Skladování by nemělo překročit třicet dní.

5. Přístroje a pomůcky ze skla

5.1 Počítací zařízení fungující na principu optické fluorescence.

Poznámka:

Zařízení musí být před použitím kalibrováno. Tím se stanoví vztah mezi objemem částic, které se mají počítat, a prahovou hodnotou, nad níž se počítání provádí. Kalibrace zařízení se provede podle pokynů výrobce za použití vzorků, jejichž obsah buněk byl stanoven mikroskopickou metodou (A).

5.2 *Vodní lázeň, s cirkulací vody, nastavitelná na 40 ± 1 °C.*

5.3 *Zkumavka, s vhodným uzávěrem, objem asi 15 ml.*

6. **Vzorek mléka**

6.1 Vzorek musí být skladován při nízké teplotě ve zkumavce (5.3). Pokud vzorek nebyl chemicky konzervován, počítání se může provést až po uplynutí 24 hodin po nadojení, neboť obsah mikroorganismů by byl příliš nízký. Skladovací teplota nesmí překročit 6 °C.

6.2 *Konzervace*

Chemická konzervace se musí provést do 24 hodin. Konzervace musí být provedena co nejdříve po odběru vzorku.

6.2.1 Chemická konzervace vzorku se provede přidáním jednoho z těchto konzervačních prostředků:

— kyselina orthoboritá:

konečná koncentrace kyseliny orthoborité ve vzorku nesmí být vyšší než 0,6 g na 100 ml. Takto konzervovaný vzorek může být skladován dalších 24 hodin při teplotě 6 až 12 °C;

— dvojchroman draselný:

konečná koncentrace dvojchromanu draselného ve vzorku nesmí být vyšší než 0,2 g na 100 ml. Takto konzervovaný vzorek může být skladován dalších 72 hodin při teplotě 6 až 12 °C;

— azid sodný:

vzorek může být konzervován azidem sodným o konečné koncentraci 0,024 g/100 ml, pokud je vzorek ochlazen na teplotu 6 až 12 °C ihned po jeho odběru a spočítán do 48 hodin po jeho odběru;

— bronopol:

vzorek může být konzervován bronopolem o konečné koncentraci 0,05 g/100 ml, pokud je vzorek ochlazen na teplotu 6 až 12 °C ihned po jeho odběru a spočítán do 72 hodin po jeho odběru.

6.2.2 Vzorek, který již byl konzervován kyselinou boritou, může být ještě konzervován dalších až 48 hodin dvojchromanem draselným.

Poznámka:

Pokud jde o vzorky konzervované dvojchromanem sodným, musí být dodrženy místní podmínky pro vypouštění odpadních vod.

7. **Postup**

7.1 *Předběžné ošetření vzorku*

Mléko, které se má vyšetřit, se po nadojení skladuje nejméně 24 hodin při asi 2-6 °C. Počítání vzorků v den nadojení se bez předběžného ošetření nedoporučuje, neboť výsledky mohou být příliš nízké. Pokud je přesto nutné počítání provést, vzorek by měl být předběžně ošetřován nejméně tři hodiny dvojchromanem draselným (viz 6.2.1).

7.2 *Příprava*

Předběžně ošetřený vzorek (viz 7.1) nebo neošetřený vzorek nejméně jeden den starý zahřát ve vodní lázni (5.2) na asi 40 °C. Poté skladovat vzorek při pokojové teplotě až do počítání.

7.3 *Počítání buněk*

Počítání se provede pomocí počítačícího zařízení (5.1) do 15 minut po skončení ohřívání (viz 7.2). Bezprostředně před počítáním vzorky důkladně promíchat, aby se dosáhlo co nejlepšího homogenního rozdělení somatických buněk.

Další ředění a příprava vzorku jsou automaticky provedeny v zařízení.

8. Spolehlivost

Výsledky opakovatelnosti (r) a reprodukovatelnosti (R) mezinárodních kruhových testů nejsou k dispozici.

Údaje, které jsou k dispozici na národní úrovni, umožňují tyto odhady:

(1) počet buněk mezi 400 000 až 500 000 naml:

— směrodatná odchylka opakovatelnosti:

$$s_r = 20\,000 \text{ buněk/ml}$$

(odpovídá variačnímu koeficientu 5–4 %)

— směrodatná odchylka reprodukovatelnosti:

$$s_R = 40\,000 \text{ buněk/ml}$$

(odpovídá variačnímu koeficientu 10–8 %)

9. Kontrola správnosti

Kontrola správnosti se provádí pomocí vzorků o známém obsahu buněk, který se stanoví počítáním buněk pod mikroskopem ve národní referenční laboratoři.

VIII. DETEKCE ANTIBIOTIK A SULFONAMIDŮ

PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato kapitola popisuje referenční postup pro detekce antibiotik a sulfonamidů v syrovém mléce a v tepelně ošetřeném mléce.

Tento referenční postup zahrnuje:

A. Kvalitativní postup

Tento postup je počáteční postup, který umožňuje vybrat vzorky mléka, které obsahují antibiotika a sulfonamidy. Popisovaný postup je jedním z několika postupů, které jsou založeny na použití *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, ATTC 10 149, co by testovacího organismu. Tento postup byl vybrán jako reprezentativní pro takovéto testy.

B. Postup pro potvrzení a identifikaci penicilinu

Tento postup se musí použít pro potvrzení výsledků kvalitativního postupu, pro identifikaci penicilinu a stanovení jeho koncentrace.

A. Kvalitativní postup

1. Předmět a oblast použití

Tento postup popisuje kvalitativní detekci antibiotik a sulfonamidů v syrovém mléce a v tepelně ošetřeném mléce, jejichž koncentrace jsou vyšší než limity uvedené v této tabulce:

Detektovatelné koncentrace různých antibiotik a sulfonamidů ⁽¹⁾

	Citlivost testu	
	Negativní	Pozitivní
Benzylpenicilin	0,002	0,006
Ampicilin	0,002	0,005
Cloxacilin	0,015	0,035
Nafcilin	0,006	0,011
Tetracyklin	0,10	0,40
Oxytetracyklin	0,20	0,45
Chlortetracyklin	0,15	0,50
Chloramfenikol	7	15
Dihydrostreptomycin	4	13
Neomycin	1	22
Kanamycin	9	28
Bacitracin	0,06	0,14
Erythromycin	1	2,25
Rifamycin	0,01	0,14
Diafenylsulfon	0,01	0,1
Sulfametazin (Sulfadimidin)	0,5	1

⁽¹⁾ Benzylpenicilin a Bacitracin jsou vyjádřeny v IU/ml, všechna ostatní antibiotika v µg/ml.

2. Definice

Mléko obsahuje antibiotika nebo sulfonamidy, pokud se barva kultivačního média nemění (viz 7.1)

3. Princip

Přidat vzorek mléka a směs živin do želírovacího agaru obsahujícího indikátor pH a spóry *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10 149 (viz 5.4.1), který má velmi dobrou citlivost, zejména na penicilin. Inkubace, která má za výsledek normální růst organismu a produkci kyseliny, způsobuje změnu barvy indikátoru pH, který se změní z purpurové na žlutou. Pokud mléko obsahuje inhibiční látky pro růst testovacího organismu, tak se purpurová barva indikátoru pH nezmění.

4. Přístroje a pomůcky ze skla

Obvyklé laboratorní vybavení, zejména:

4.1 Přístroje

4.1.1 Inkubátor, nastavitelný na 64 ± 1 °C

4.1.2 Vodní lázeň, nastavitelná na 64 ± 1 °C

4.1.3 Stojánek na zkumavky nebo ampule

4.1.4 Injekční mikrostříkačka na jedno použití, odběr vzorků a dávkování po 0,1 ml

4.1.5 Kleštičky nebo pinzeta

4.1.6 Horkovzdušná sušárna, nastavitelná na 170 až 175 °C

4.1.7 Autokláv, nastavitelný na 121 ± 1 °C

4.1.8 pH-metr

4.2 Pomůcky ze skla

4.2.1 Lahvičky na vzorky s vhodnými uzávěry

Poznámka:

Některé pryžové zátky mohou vylučovat na hrdlo lahvičky inhibiční látky.

4.2.2 Petriho misky ze sterilního syntetického materiálu nebo z čirého bezbarvého skla; o minimálním vnitřním průměru asi 140 mm, se zcela rovným dnem.

4.2.3 Láhve o objemu 250 ml

4.2.4 Pipety (utěsněné vatou), skleněné nebo ze sterilního syntetického materiálu, o nominálním objemu 1 ml a 10 ml.

4.2.5 Skleněné špachtle

4.2.6 Zkumavky nebo ampule o vnitřním průměru asi 8 mm, s víčky nebo zátkami.

4.2.7 Sterilizace pomůcek ze skla:

Pomůcky ze skla se sterilizují jedním z těchto postupů:

a) v horkovzdušné sušárně (4.1.6), nejméně jednu hodinu při teplotě 170–175 °C;

b) v autoklávu (4.1.7), nejméně 20 minut při teplotě 121 ± 1 °C.

Při použití autoklávu je nutné dbát na to, aby bylo zajištěno dostatečné proniknutí páry; pokud se materiál sterilizuje v nádobách, tyto nádoby by neměly být napevno uzavřeny, uzávěry nebo víčka by měly být volné.

Pomůcky ze skla sterilizované v autoklávech by se měly vysušit odvětráním páry.

Pipety musí být sterilizovány v horkovzdušné sušárně.

5. Kultivační média, roztoky, testovací organismus

Základní složky kultivačních médií musí být vhodné pro bakteriologické účely. Musí se použít destilovaná voda ve skle nebo demineralizovaná voda alespoň odpovídající čistoty. Voda nesmí obsahovat inhibiční látky pro růst testovacího organismu.

5.1 *Kultivační médium*

5.1.1 Živný agar

Složení:

Kvasnicový extrakt	2 g
Pepton	5 g
Masový extrakt	1 g
Chlorid sodný	5 g
Agar	10–15 g
Voda	1 000 ml

Příprava:

Rozpustit složky ve vodě. Za občasného míchání uvést do varu. Upravit pH tak, aby po sterilizaci byla jeho hodnota $7,4 \pm 0,1$ při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rozdělit po 10 ml do zkumavek nebo po 100 ml do lahviček a naklonit s cílem získat šikmý agar.

Sterilizovat 15 minut při $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.2 Agarové médium

Složení:

Chlorid sodný	2 g
Agar	15 g
Voda	1 000 ml
Roztok trimethoprimu nebo tetroxoprimu (viz 5.1.3) ⁽¹⁾	10 ml

Příprava:

Rozpustit složky ve vodě, s výjimkou trimethoprimu nebo tetroxoprimu. Za občasného míchání uvést do varu. Přidat trimethoprim nebo tetroxoprim a sterilizovat 15 minut při $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Upravit pH, aby po sterilizaci byla jeho hodnota $7,0 \pm 0,1$ při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.3 Roztok trimethoprimu či tetroxoprimu

Složení:

Trimethoprim	5 mg
nebo Tetroxoprim	30 mg
96 % Ethanol	5 ml/30 ml
Vodado	1 000 ml

Příprava:

Rozpustit v ethanolu trimethoprim nebo tetroxoprim (5 nebo 30 ml) a doplnit vodou.

5.1.4 Živný roztok

Složení:

Kvasnicový extrakt	0,75 mg
Glukóza	5,0 mg
Rozpustný škrob	8,0 mg
Bromkresolová červeň	0,025 g
Voda	50 ml

Příprava:

Rozpustit ve vodě živný roztok a indikátor, pokud to je nutné, zahřívát a sterilizovat filtrací. Živný roztok je dostupný v tabletách.

5.2 *Standardní roztoky penicilinu*

5.2.1 Ve sterilní láhvi s vhodným uzávěrem připravit roztok penicilinu o $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ (100 IU/ml), a to rozpouštěním krystalického benzylpenicilinu sodného nebo draselného ve sterilní destilované vodě.

5.2.2 Připravit pracovní roztok penicilinu vložением 1,25 ml roztoku penicilinu (5.2.1) sterilní destilované vody a doplnit na do 1 000 ml. Tento pracovní roztok obsahuje $0,075\text{ }\mu\text{g}$ penicilinu/ml (= $0,125\text{ IU/ml}$).

5.2.3 Připravit 75 ml standardního roztoku penicilinu obsahujícího $0,004\text{ }\mu\text{g}$ penicilinu/ml (= $0,0067\text{ IU penicilinu/ml}$) přidáním 4 ml pracovního roztoku penicilinu (5.2.2) do 71 ml mléka bez inhibičních látek (5.3).

⁽¹⁾ Při používání kultivačního média obsahujícího antifoláty musí být dodrženy právní předpisy o patentech.

- 5.2.4 Roztoky penicilinu uvedené podle bodů 5.2.1 až 5.2.3 by měly být připraveny v den provádění testu.

5.3 *Mléko bez inhibičních látek*

Připravit kontrolní preparát *mléka bez inhibičních látek* rozpuštěním sušeného odstředěného mléka (10 % m/V) ve vodě, které bylo předtím otestováno na přítomnost inhibičních látek. Rovněž lze použít přiměřené množství čerstvého mléka, které bylo otestováno a prohlášeno za prosté inhibičních látek; toto mléko se rozdělí do lahví a zahřívá se jednu hodinu na 100 °C, poté je uloženo do chladničky s teplotou 0 °C až 6 °C na dobu nejvýše jednoho týdne.

5.4 *Testovací organismus*

- 5.4.1 Jako testovací organismus se použije *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10 149 Kmen ATCC 10149 je identický s kmenem C 953.

- 5.4.2 Připravit *zásobní kulturu* pro udržování testovací kultury. Testovací kultura se pěstuje na šikmém živném agaru (5.1.1). Šikmý agar se v prouzcích naočkuje smyčkou testovací kultura, poté se aerobně inkubuje 48 hodin při 63 ± 1 °C. Po inkubaci uzavřít zkumavku sterilní pryžovou zátkou. Takto získaná zásobní kultura může být skladována několik měsíců v chladničce při 0 až 5 °C.

5.5 *Testovací kultura (suspenze spór)*

- 5.5.1 Asepticky přenést 20 ml živného agaru (5.1.1) do sterilní Petriho misky (4.2.2) a nechat zchladit na pokojovou teplotu.

- 5.5.2 Sterilní pipetou (4.2.4) přenést 5 ml sterilní destilované vody do zkumavky se zásobní kulturou (5.4.2) a vymýt sterilní smyčkou spóry ze šikmého agaru. Suspenze spór se chová při 0 až 5 °C a použije se do 36 hodin.

- 5.5.3 Sterilní pipetou (4.2.4) přenést 5 ml suspenze spór (5.5.2) na Petriho misku (5.5.1) a důkladně rozestřít očkovací látku po celém povrchu pomocí zahnuté skleněné tyčinky. Inkubovat 16 až 18 hodin při 63 ± 1 °C (4.1.1).

Při použití zásobní kultury (5.4.2) nebo kultury starší 36 hodin by očkování mělo provést nejmeně dvakrát v časovém intervalu maximálně 36 hodin.

- 5.5.4 Sterilní pipetou (4.2.4) přenést 10 ml destilované vody na Petriho misku obsahující kulturu (5.5.3) a skleněnou tyčinkou odstranit spóry z povrchu.

Přenést suspenzi spór do láhve (4.2.3) obsahující 250 ml sterilní destilované vody. Láhev uzavřít a důkladně protřepat. Kultury, které nejsou ihned přeočkovány, by se měly skladovat v chladničce při 0 až 6 °C.

- 5.5.5 Po 16ti až 18ti hodinové inkubaci při 63 ± 1 °C na agarovém médiu by suspenze spór měla vykazovat počet životaschopných mikroorganismů mezi 5 a 10 miliony na mililitr. Suspenze spór musí vykazovat rovnoměrné zakalení, a pokud obsahuje sraženiny nebo usazeninu, měla by se nahradit novou suspenzí připravenou ze zásobní kultury (5.4.2).

5.6 *Příprava zkumavek/ampulí*

- 5.6.1 Nechat rozpustit agarové médium (5.1.2), poté zchladit na 55 °C.

- 5.6.2 Přidat část suspenze čerstvých spór (5.5.4) k pěti částem agarového média (5.6.1) ve zkumavce nebo v lahvičce. Důkladně promíchat.

- 5.6.3 Přenést do sterilní zkumavky nebo ampule (4.2.6) 0,3 ml naočkovaného média (5.6.2), aby se vytvořila 5 mm vrstva, poté uzavřít zkumavku zátkou nebo víčkem nebo, v případě ampule, zatavením konce. Nechat agarové médium ztuhnout, poté nechat zkumavky/ampule 12 hodin ve svislé poloze.

- 5.6.4 Zkumavky/ampule mohou být použity týž den, ale mohou být rovněž skladovány několik měsíců při 0–6 °C, pokud byly ihned po jejich přípravě ochlazeny.

6. **Postup**

- 6.1 Vzorky se co nejdříve otestují, nejlépe do 24 hodin po odběru, a do té doby se skladují při teplotě 0–5 °C. Pokud není možné otestovat vzorky do 24 hodin, měly by se uchovat hluboko zmrazené (–30 °C až –15 °C), aby se omezila na minimum inaktivace penicilinu.

- 6.2 Čitelně a nesmazatelně identifikovat každou zkumavku/ampuli (5.6). Odstranit víčko nebo zátku. Umístit do vhodného stojánu počet požadovaný pro vzorky a testy (5.2 a 5.3).
- 6.3 Do každé zkumavky/ampule přidat 50 mikrolitrů živního roztoku (5.1.4).
- 6.4 Vzorek mléka řádně promíchat a mikrostříkačkou (4.1.4) přenést 0,1 ml vzorku do označené zkumavky/ampule. Pro přenesení každého vzorku použít vždy novou injekční stříkačku.
- 6.5 Postup podle bodu 6.4 se opakuje stejným způsobem za použití standardního roztoku penicilinu obsahujícího 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml) penicilinu namísto vzorku mléka (5.2.3).
- 6.6 Postupem podle bodu 6.4 opakujte stejným způsobem za použití kontrolního vzorku mléka bez inhibičních látek (5.3) namísto vzorku mléka.
- 6.7 Uzavřít zkumavky/ampule a stojánek se zkumavkami/ampulemi umístit na nejméně 2½ až 2¾ hodiny do vodní lázně s teplotou 63 ± 1 °C (4.1.2).
- 6.8 Vyjmout stojánek se zkumavkami/ampulemi z vodní lázně.
- 6.9 Pozorovat barvu agarového média (viz 7).

7. Interpretace výsledků

- 7.1 Purpurové zabarvení agarového média ve zkumavkách/ampulích se standardním roztokem penicilinu nebo testovacím vzorkem mléka ukazuje na přítomnost antibiotik nebo sulfonamidů ve vzorku v koncentraci nebo přibližné koncentraci „zcela pozitivní“ uvedené v tabulce na straně 39. Pokud zabarvení ve zkumavkách/ampulích se standardním roztokem penicilinu (6.5) zůstane purpurové, agarové médium je dostatečně citlivé.
- 7.2 Částečné purpurové zbarvení agarového média nebo nepravidelné zabarvení ve zkumavkách/ampulích se vzorkem mléka ukazuje na přítomnost inhibičních látek ve vzorku v koncentracích mezi koncentracemi uvedenými na straně 39.
- 7.3 Žluté zabarvení agarového média ve zkumavkách/ampulích obsahujících vzorek mléka bez inhibičních látek nebo vzorek mléka ukazuje na nepřítomnost inhibičních látek v testovacím organismu.
- 7.4 Pokud se purpurové zabarvení objeví ve všech testovaných zkumavkách/ampulích, včetně negativních kontrol, zkumavky/ampule neobsahují životaschopné spóry a vzorky musí být podrobeny novému testování s čerstvě připraveným testovacím materiálem.

8. Potvrzení výsledků

- 8.1 Potvrdit výsledky všech vzorků s reakcemi popsány v 7.1 a 7.2 podle metody „B“.

Pokud je nezbytné vzorky mléka před potvrzením skladovat, musí být zmrazeny, aby se zabránilo poškození antibiotik.

B. Postup pro potvrzení penicilinů a stanovení koncentrace

1. Předmět a oblast použití

Tento postup popisuje konfirmační test penicilinu nebo jiných antibiotik, jakož postup pro stanovení koncentrace penicilinu ve vzorcích mléka s pozitivní (A.7.1) nebo podezřelou reakcí (A.7.2).

Citlivost postupu pro různá antibiotika

Viz A.1.

2. Definice

- 2.1 Vzorek mléka obsahuje antibiotika, včetně sulfonamidů, pokud popsáním postupem vytvoří čirou inhibiční zónu nejméně 2 mm kolem disku.

- 2.2 Pokud vzorek, který obsahuje antibiotika, včetně sulfonamidů (2.1), a ke kterému byla přidána penicilináza (beta-laktamáza), nevytvoří čirou zónu nebo vytvoří čirou zónu menšího průměru než je průměr zóny bez penicilinázy, *inhibiční látkou je buď penicilin nebo směs penicilinu a jiného antibiotika včetně sulfonamidů.*

- 2.3 Pokud tato zóna není penicilinázou (2.2) inaktivována, inhibiční látkou ve vzorku mléka *není penicilin*, ale může to být *jiné reziduum* [viz směrnice 85/397/EHS, příloha A, kapitola VI, A.1.f) a 2b)].

Některé polosyntetické peniciliny, například cloxacillin sodný, nejsou nebo jsou pouze částečně inaktivovány penicilinázou nebo jsou odolné a nemohou být identifikovány jako peniciliny (viz 7.3).

3. Princip

Absorpční papírový disk napuštěný mlékem, které se má vyšetřit, se umístí na povrch agarového média naočkovaného *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Normální růst mikroorganismu po inkubaci narušuje agarové médium. Čirá zóna kolem disku ukazuje, že jsou v mléce přítomny látky inhibiční látky pro růst. Velikost čiré zóny mimo jiné závisí na koncentraci a druhu inhibiční látky v mléce.

4. Přístroje, pomůcky ze skla a vybavení

4.1 Přístroje

4.1.1 Viz A.4.1.

4.1.2 Vodní lázeň, nastavitelná na 80 ± 1 °C.

4.2 Pomůcky ze skla

Viz A.4.2.

4.3 Papírové disky, neobsahující inhibiční látky, o průměru 9 až 13 mm, schopné absorbovat asi 130 mg mléka (nejlépe skladovat v exsikátoru).

5. Kultivační média, standardní roztoky, roztok penicilinázy, činidla testovací organismus atd.

Základní složky kultivačních médií musí být vhodné pro bakteriologické účely. Musí se použít destilovaná voda ve skle nebo demineralizovaná voda alespoň odpovídající čistoty. Voda nesmí obsahovat inhibiční látky pro růst testovacího organismu.

5.1 Kultivační média

5.1.1 Živný agar (A.5.1.1)

5.1.2 Kultivační médium pro detekci inhibičních látek

Složení:

Kvasnicový extrakt	2,5 g
Trypton	5 g
Glukóza	1 g
Roztok trimethoprimu či tetroxoprimu (A.5.1.3)	10 ml
Agar	10–15 g podle želírovacích vlastností agaru
Voda	1 000 ml

Příprava:

Při zahřívání a míchání zcela rozpustit pevné složky ve vodě, poté přidat roztok trimethoprimu nebo tetroxoprimu. Po přidání trimethoprimu nebo tetroxoprimu upravit hodnotu pH, aby po sterilizaci byla $8,0 \pm 0,1$ při 25 °C. Sterilizovat médium 15 minut při 121 ± 1 °C.

5.2 Standardní roztoky penicilinu v mléku

Viz A.5.2.

Pro kvantitativní stanovení inhibičních látek (8) připravit standardní roztoky penicilinu v mléce bez inhibičních látek (A.5.3) v těchto koncentracích:

- a) 0,004 µg/ml (0,0067 IU/ml)
- b) 0,006 µg/ml (0,01 IU/ml)
- c) 0,03 µg/ml (0,05 IU/ml)
- d) 0,06 µg/ml (0,01 IU/ml).

5.3 Roztok penicilinázy

- 5.3.1 Rozpustit dostatečné množství penicilinázy (beta-laktamázy) ve sterilní destilované vodě s cílem získat koncentraci 1 000 U/ml. Tento roztok, nejlépe rozdělený na menší dávky, je možné skladovat až čtyři týdny při 0 °C až 5 °C.

Poznámka

Pro penicilinázu neexistuje jednotná mezinárodní norma. Pro účely tohoto postupu se předpokládá, že deset jednotek penicilinázy stačí na inaktivaci 0,6 µg (= 1 IU) penicilinu. U penicilinázy s neznámou koncentrací je nutné zkontrolovat, zda tento předpoklad platí. V případě nutnosti proto upravit koncentraci roztoku penicilinázy.

- 5.3.2 Namísto roztoku penicilinázy je možné použít běžně dostupné disky napuštěné penicilinázou, pokud se kontrolním postupem zjistí, že obsahují odpovídající množství penicilinázy.

5.4 Testovací organismus

Viz A.5.4.

5.5 Testovací kultura (suspenze spór)

Viz A.5.5.

5.6 Příprava Petriho misek

- 5.6.1 Nechat rozpustit agarové médium pro detekci inhibičních látek (5.1.2), poté zchladit na 55 °C.
- 5.6.2 Do láhve přidat část suspenze čerstvých spór (5.5) k nezbytnému množství částí agarového média pro detekci inhibičních látek (5.1.2), s cílem získat vhodnou hustotu kolonií v naočkovaném agarovém médiu, a důkladně promíchat.
- 5.6.3 Přenést do sterilní Petriho misky (A.4.2.2), předem vyhřáté na 55 °C, naočkované agarové médium, aby se vytvořila 0,6 až 0,8 mm vrstva. Pro Petriho misku o vnitřním průměru 140 mm je třeba asi 15 ml agarového média, aby se vytvořila 0,8 mm vrstva.
- 5.6.4 Umístit Petriho misky na chladný, vodorovný povrch, jehož vodorovnost se ověří vodováhou, sejmut víčka a nechat agarové médium ztuhnout. Po ztuhnutí média, vrátit víčka na misky a obrátit je dnem vzhůru, aby se na zabránilo kondenzaci vody na povrchu agarového média.
- 5.6.5 Takto připravené Petriho misky se použijí nejlépe ještě též den, ale mohou být používány maximálně dva týdny, pokud se ihned po přípravě vloží do zataveného polyethylenového vaku a uchovávají se při 5 °C.
- 5.6.6 Označit dna Petriho misek, aby byla možná identifikace vzorků.

6. Postup

6.1 Příprava vzorku

- 6.1.1 U vzorků s pozitivním nebo pochybným výsledkem podle „metody A“ (A.7.1 a A.7.2) musí být provedeno nové testování za účelem identifikace a kvantitativního stanovení penicilinu.
- 6.1.2 Nejříve zahřívat vzorky 10 minut na 80 ± 1 °C, aby se vyloučil vliv nespecifických termolabilních inhibičních látek.
- 6.1.3 Důkladně promíchat, poté přenést asi 10 ml vzorku zahřátého mléka do sterilní lahvičky se širokým hrdlem. K mléku přidat asi 0,4 ml roztoku penicilinázy (5.3) a řádně promíchat.

6.2 *Detekce inhibičních látek*

- 6.2.1 Ponořit papírový disk (4.3) do vzorku mléka (6.1.2) pomocí čisté a suché pinzety. Odstranit přebytečné mléko otřením disku o lahvičku se vzorkem. Naplocho položit disk na povrch Petriho misky (5.6) a lehce přitlačit pinzetou.
- 6.2.2 Disky napuštěné různými vzorky mléka musí být vzdáleny jeden od druhého nejméně 20 mm a od okraje nejméně 10 mm.
- 6.2.3 Pro kontrolu citlivosti se disky (4.3) napuštěné standardním roztokem penicilinázy (5.2) musí nahodile rozmístit mezi disky napuštěné vzorky mléka v poměru nejméně 2 % počtu disků se vzorky mléka; při každém testu se použije nejméně pět standardních disků.
- 6.2.4 Po nahodilém rozmístění všech disků na agarové médium a po jejich identifikaci, obrátit misky dnem vzhůru a nechat je inkubovat 2,5 až 5 hodin při 63 ± 1 °C.
- 6.2.5 Po inkubaci vyšetřit misky při vhodném zdroji světla, aby bylo možné pozorovat čiré inhibiční zóny kolem papírových disků. Čiré zóny se změří.
- 6.2.6 Standardní roztok penicilinázy (6.2.3) musí kolem disku vytvořit nejméně 2 mm zóny.
- 6.2.7 Čiré zóny kolem disků napuštěných vzorky mléka, jejichž velikost je stejná nebo větší než velikost popsaná v 6.2.6, ukazují na přítomnost inhibičních látek v testovacím organismu.

6.3 *Identifikace a kvantifikace inhibičních látek*

- 6.3.1 Postup 6.2.1 se provádí dvojmo se vzorkem zahrátého mléka (6.1.2) a se vzorkem ošetřeným penicilinázou (6.1.3). Namísto přidání penicilinázy do 10 ml vzorku mléka je možné do vzorku mléka ponořit disk napuštěný penicilinázou (5.3.2) a uložit ho na testovací misku.
- 6.3.2 Postup 6.2.1 se provede dvojmo pro každý ze standardních roztoků penicilinu popsanych v 5.2 a) až d).
- 6.3.3 Vypočítat průměrný průměr čirých inhibičních zón pro vzorky mléka, kontrolní vzorky penicilinázy a pro standardní roztoky penicilinu.

7. **Interpretace výsledků (viz 2)**

- 7.1 Pokud se kolem disku napuštěném kontrolní penicilinázou nevytvoří žádná čirá zóna, ale čirá zóna se objeví kolem disku napuštěném vzorkem mléka, stejně velká nebo větší než zóna kolem disku napuštěném standardním roztokem penicilinu (5.2a)), inhibiční látka ve vzorku mléka odpovídá koncentraci krystalického benzylpenicilinu sodného rovné nebo vyšší než 0,004 µg/ml.
- 7.2 Pokud se průměrná hodnota průměru čiré zóny kolem disku napuštěném kontrolní penicilinázou rovná průměrné hodnotě průměru čiré zóny kolem disku se vzorkem mléka, mléko obsahuje inhibiční látky, které není možné inaktivovat koncentrací penicilinázy použité v tomto postupu.
- 7.3 Pokud je průměrná hodnota průměru čiré zóny kolem disku napuštěném kontrolní penicilinázou menší než průměrná hodnota průměru čiré zóny kolem disku se vzorkem mléka zahrátého podle 6.1.2, vzorek mléka obsahuje penicilin a antibiotika, včetně sulfonamidů, a penicilin nebo polosyntetický penicilin, který nelze identifikovat koncentrací penicilinázy použité v tomto po. Syntetické peniciliny, jako je cloxacillin sodný, nemusejí být inaktivovány penicilinázou za popsanych podmínek a mohou být tudíž klasifikovány jako inhibiční látky jiné než penicilin.

Poznámka

Pokud to je nezbytné, inhibiční látky jiné než penicilin mohou být identifikovány vhodnými postupy.

8. **Stanovení obsahu penicilinu**

- 8.1 Stanovení obsahu penicilinu může být provedeno buď po sestrojení standardní křivky, nebo výpočty na základě velikostí zón získaných se standardními roztoky penicilinu v mléce (5.2 a) až d)).

8.2 *Sestrojení standardní křivky*

Vzhledem k tomu, že existuje lineární korelace mezi $\log_{10}$ koncentrace penicilinu a průměrem inhibičních zón, standardní křivku lze sestavit na logaritmický papír vyznačením koncentrací penicilinu na pořadnici a průměr zón na úsečku. Inhibiční zóny se počítají na základě průměru zdvojeného testu. Průměry inhibičních zón se graficky vyznačí na základě standardních koncentrací penicilinu a zakreslí se standardní křivka.

8.3 *Výpočet*

Koncentrace penicilinu ve vzorku mléka lze vypočítat na základě průměru zón vzorků pomocí rovnice nebo je odečíst ze standardní křivky. Pro přesné stanovení je poloměr inhibičních zón nejmenší dvakrát větší, avšak nejvýše pětkrát větší než poloměr disků.

9. **Vyjádření výsledků**

9.1 Výsledky se vyjadřují jako obsah penicilinu rovný nebo vyšší než 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (nebo uvedením stanovené koncentrace) nebo jako obsah inhibičních látek jiných než penicilin.

9.2 *Opakovatelnost (r) a reprodukovatelnost (R)*

Údaje nejsou k dispozici a jsou nevýznamné v důsledku použití standardu při porovnání.

IX. DETEKCE PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ**1. Předmět a oblast použití**

V souladu s požadavky směrnice 85/397/EHS, přílohy A, kapitoly VII bodu 2, tento postup představuje pokyny, které musí být dodržovány, pro detekci patogenních mikroorganismů v pasterovaném mléce.

2. Definice

Vyšetření se musí provést u bakterií, které jsou nejčastější příčinou onemocnění pocházejících z potravin.

Pasterace je ošetření, které ochraňuje mléko proti netermorezistentním patogenům. Pokud jsou splněny normy stanovené v příloze A, kapitole VII části 2 uvedené směrnice, pokud jde o počítání kolonií při 30 °C a 21 °C, koliformní bakterie a fosfatázu, specifický test na detekci patogeny je nezbytný pouze tehdy, pokud existuje podezření, že mléko má nějakou spojitost se propuknutím otravy potravinami.

3. Postup

Postupy a četnost vyšetření musí stanovit vnitrostátní orgán takovým způsobem, který umožní vydávání osvědčení o zdravotní nezávadnosti pro tepelně ošetřené mléko pro obchod uvnitř Společenství. Pro detekci patogenních mikroorganismů se, pokud existují, použijí kritéria a postupy přijaté na mezinárodní úrovni.

4. Zpráva o výsledku

Pro každý vyšetřovaný patogenní mikroorganismus musí být výsledek vyjádřen takto:

Počet mléka na mililitr, nebo „přítomnost“ či „nepřítomnost“ v objemu pasterovaného mléka, který požaduje použitý postup. Zpráva musí jasně popsat použitý postup.
