

Dansk udgave

Retsforskrifter

Indhold

I *Retsakter hvis offentliggørelse er obligatorisk*

.....

II *Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk*

Kommissionen

91/180/EØF:

- ★ **Kommissionens beslutning af 14. februar 1991 om visse analyse- og prøvemethoder for rå mælk og varmebehandlet mælk** 1

II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 14. februar 1991

om visse analyse- og prøvemetoder for rå mælk og varmebehandlet mælk

(91/180/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Euro-
pæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 85/397/EØF af 5.
august 1985 om sundhedsmæssige og dyresundhedsmæssige
problemer i forbindelse med handelen inden for Fællesskabet
med varmebehandlet mælk ⁽¹⁾, senest ændret ved direktiv
89/662/EØF ⁽²⁾, særlig artikel 10, stk. 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ifølge artikel 10, stk. 2, i direktiv 85/397/EØF fastsætter
Kommissionen de analyse- og prøvemetoder, der skal benyt-
tes til at kontrollere, om normerne for rå mælk og varmebe-
handlet mælk overholdes;

for rå mælk bør der fastsættes metoder, hvorved kimal,
celletal, frysepunkt og tilstedeværelse af antibiotika kan
bestemmes;

for pasteuriseret mælk bør der fastsættes metoder, hvorved
fravær af patogene kim, antal koliforme bakterier, kimal,
fravær af fosfatase, tilstedeværelse af peroxidase, fravær af
antibiotika og frysepunkt kan bestemmes;

for steriliseret mælk og UHT-mælk bør der fastsættes
metoder, hvorved kimal og fravær af antibiotika kan
bestemmes;

af tekniske årsager bør der i første omfang fastsættes
referenceanalyse- og -prøvetoder med henblik på at sikre
overholdelse af visse normer; det er især vigtigt at fortsætte
med at undersøge betingelserne for at bruge rutineanalyse- og
-prøvetoder; indtil resultatet af denne undersøgelse fore-
ligger, påhviler det de kompetente myndigheder at drage
omsorg for, at der bruges passende rutinetoder med
henblik på at sikre, at normerne i direktiv 85/397/EØF
overholdes;

bestemmelsen af referenceanalyse- og -prøvetoder omfat-
ter bestemmelse af analysemetoder og fastsættelse af pålidel-
hedskriterier for at sikre ensartet fortolkning af resulta-
terne;

de i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overens-
stemmelse med udtalelse fra Den Stående Veterinærkomite —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Referencemetoderne for analyse og prøvning af rå mælk er
følgende:

- bestemmelse af frysepunkt
- tælling af mirkoorganismer — kimal ved 30 °C
- tælling af somatiske celler
- påvisning af antibiotika og sulfamider.

⁽¹⁾ EFT nr. L 226 af 24. 8. 1985, s. 13.

⁽²⁾ EFT nr. L 395 af 30. 12. 1989, s. 13.

Artikel 2

Referencemetoder for analyse og prøvning af pasteuriseret mælk er følgende:

- bestemmelse af frysepunkt
- bestemmelse af fosfataseaktivitet
- bestemmelse af peroxidaseaktivitet
- tælling af mikroorganismer — kimtal ved 30 °C
- tælling af mikroorganismer — kimtal ved 21 °C
- tælling af koliforme bakterier — antal kolonier ved 30 °C
- påvisning af antibiotika og sulfamider
- påvisning af patogene mikroorganismer.

Artikel 3

Referencemetoderne for analyse og prøvning af UHT-mælk og steriliseret mælk er følgende:

- bestemmelse af frysepunkt
- tælling af mikroorganismer — kimtal ved 30 °C
- påvisning af antibiotika og sulfamider.

Artikel 4

Iværksættelsen af referenceanalyse- og -prøvemethoderne, pålidelighedskriterierne og indsamlingen af prøver foretages i henhold til bilag I.

Artikel 5

De i artikel 1, 2 og 3 omhandlede referenceanalyse- og -prøvemethoder er beskrevet i bilag II.

Artikel 6

Denne beslutning tages op til fornyet overvejelse inden den 31. december 1992 for at tage hensyn til udviklingen i den videnskabelige og tekniske viden.

Artikel 7

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 14. februar 1991.

På Kommissionens vegne
Ray MAC SHARRY
Medlem af Kommissionen

BILAG I

INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
I. Generelle bestemmelser	4
II. Prøveudtagning af rå og varmebehandlet mælk	6

I. GENERELLE BESTEMMELSER

1. Indledning

De generelle bestemmelser gælder for reagenser, udstyr, angivelse af resultater, nøjagtighed og prøverapport. Medlemsstaternes kompetente myndigheder og de kontrollaboratorier, der står for prøveudtagning og kontrol af mælk, skal overholde de generelle bestemmelser.

2. Reagenser

2.1. Vand

2.1.1. Vand til opløsning, fortynding eller skylning skal, medmindre andet er angivet, være destilleret vand, ionbyttet vand eller demineraliseret vand af mindst tilsvarende renhed. Til mikrobiologiske formål skal det være fri for stoffer, som kan påvirke væksten af mikroorganismer ved prøvens udførelse.

2.1.2. Ved »opløsning« eller »fortynding« uden yderligere angivelse forstås »opløsning i vand« eller »fortynding med vand«.

2.2. Kemikalier

Alle anvendte kemikalier skal, medmindre andet er angivet, være af anerkendt analysekvalitet for reagenser.

3. Udstyr

3.1. Lister over udstyr

Listerne over udstyr i de forskellige referencemetoder indeholder kun elementer med en særlig anvendelse og elementer med bestemte specifikationer.

3.2. Analysevægt

En analysevægt er en vægt, der kan veje med en præcision på 0,1 mg.

4. Angivelse af resultater

4.1. Resultater

Det i analyserapporten angivne resultat skal, medmindre andet er angivet, være den aritmetriske middelværdi af to prøver, som opfylder det angivne repeterbarhedskriterium (5.1) for den pågældende metode. Hvis repeterbarhedskriteriet ikke opfyldes, skal den pågældende prøve gentages eller resultatet erklæres ugyldigt.

4.2. Procentberegning

Resultatet skal, medmindre andet er angivet, beregnes som en vægtprocent af prøven.

5. Nøjagtighedskriterier: Repeterbarhed og reproducerbarhed

5.1. Nøjagtighedskriterierne for hver metode defineres som følger:

5.1.1. *Repeterbarhed* (r) er den værdi, der ligger under den absolute forskel mellem to enkelte prøveresultater, som er opnået ved samme metode på identisk prøvemateriale under samme betingelser (samme operatør, samme apparatur, samme laboratorium og med et kort tidsinterval).

5.1.2. *Reproducerbarhed* (R) er den værdi, der ligger under den absolute forskel mellem to enkelte prøveresultater, som er opnået ved samme metode på identisk prøvemateriale under forskellige betingelser (forskellige operatører, forskelligt apparatur, forskellige laboratorier og/eller forskelligt tidsinterval).

- 5.1.3. Værdierne for repeterbarheds- og reproducerbarhedskriterier anført i de relevante punkter for hver metode udgør de konfidensniveauintervaller på 95 %, som er defineret i ISO 5725: 2. udgave 1986, medmindre andet er angivet. De beregnes på grundlag af resultaterne af anerkendte sammenlignende prøver, som er benyttet til at evaluere metoderne. Der er dog ikke gennemført sammenlignende prøver for visse af metoderne. I disse tilfælde er repeterbarheds- og reproducerbarhedsværdierne anslået.
- 5.1.4. De sammenlignende prøver og undersøgelser, der omhandles i punkt 5.1.3, skal planlægges og udføres i overensstemmelse med de internationale retningslinjer.

6. **Prøverapport**

Prøverapporten skal specificere den anvendte analysemetode samt de opnåede resultater. Den skal desuden oplyse eventuelle enkeltheder om anvendt metodik, som ikke er specificeret i analysemetoden, eller som ikke er obligatorisk, samt eventuelle andre omstændigheder, som kan have påvirket de opnåede resultater. Prøverapporten skal indeholde alle nødvendige oplysninger til fuldstændig identifikation af prøven.

II. PRØVEUDTAGNING AF RÅ OG VARMEBEHANDLET MÆLK

1. Omfang og anvendelsesområde

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til udtagning af prøver af rå og varmebehandlet mælk. Denne metode til udtagning, transport og opbevaring af prøver gælder for rå mælk fra producentens mælkerum samt for rå og varmebehandlet mælk i lager- og transporttanke.

De i punkt 2, 4.4, 5 og 6 anførte metoder gælder for prøveudtagning af varmebehandlet mælk til direkte konsum.

2. Generelt

Prøveudtagning af rå og varmebehandlet mælk i junger, tanke m.v. skal foretages af en medarbejder, der er passende oplært inden prøveudtagningen.

Hvis det anses for nødvendigt, skal prøveudtagningspersonalet af de kompetente myndigheder eller kontrollaboratoriet instrueres om prøveudtagningsteknik med henblik på at sikre, at prøven er repræsentativ for og i overensstemmelse med hele partiet.

Hvis det anses for nødvendigt, skal prøveudtagningspersonalet af de kompetente myndigheder eller kontrollaboratoriet instrueres om mærkning af prøven med henblik på sikker identifikation af den.

3. Prøveudtagningsudstyr

3.1. Generelt

Prøveudtagningsudstyret skal være af rustfrit stål eller andet egnet materiale af passende styrke og med en til formålet (blanding, prøveudtagning m.v.) egnet konstruktion. Rørestænger eller røreværker til blanding af væsker i beholdere skal have et tilstrækkeligt omfang til at blande produktet passende, uden at der udvikles harsk smag. Øser skal have et solidt håndtag, som er langt nok til at muliggøre prøveudtagning på en hvilken som helst dybde i beholderen. Øsens kapacitet skal være mindst 50 ml.

Prøvebeholdere og lukkeanordninger skal være af glas, egnet metal eller plastik.

Prøveudtagningsudstyrets (herunder beholdere og lukkeanordninger) konstruktionsmateriale må ikke forårsage ændringer i prøven, som kan indvirke på resultatet af undersøgelserne. Alle overflader på prøveudtagningsudstyr og -beholdere skal være rene, tørre, glatte og fri for sprækker; hjørner skal være afrundede.

3.2. Prøveudtagningsudstyr til mikrobiologisk undersøgelse

Prøveudtagningsudstyr, herunder beholdere, skal ud over bestemmelserne i punkt 3.1 være sterile.

Hvis det samme prøveudtagningsudstyr anvendes til flere prøveudtagninger, skal det efter hver prøveudtagning rengøres og steriliseres ifølge de af kontrollaboratoriet eller den kompetente myndighed givne anvisninger eller krav på en sådan måde, at ingen prøver forurenes af en forudgående prøve.

4. Prøveudtagningsteknik

4.1. Generelt

Uanset hvilken undersøgelse, der skal udføres, skal mælken enten manuelt eller mekanisk blandes grundigt før prøveudtagningen.

Prøven udtages umiddelbart efter blandingen, mens mælken stadig er i bevægelse.

Når der samtidig udtages flere prøver af mælk i tanke til forskellige undersøgelser, skal prøven til den mikrobiologiske undersøgelse udtages først.

Prøvens volumen skal være i overensstemmelse med kravene. De anvendte prøvebeholdere skal have en sådan kapacitet, at de næsten fyldes helt af prøven, således at indholdet kan blandes ordentligt inden undersøgelsen, samtidig med at der undgås kærning under transporten.

4.2. Manuel prøveudtagning

4.2.1. Prøveudtagning fra mælkespande og -junger

For at opnå blanding bevæges en rørestang hurtigt op og ned i spanden eller junglen, så det sikres, at mælken blandes ordentligt, og at der ikke hænger fløde fast ved jungens hals. Der skal udtages en repræsentativ prøve for hele partiet i overensstemmelse med punkt 4.2.4.

4.2.2. Prøveudtagning fra gårdtanke

Mælken omrøres mekanisk eller manuelt, indtil der opnås tilstrækkelig homogenitet.

Hvis mælkemængden er for lille til, at den mekaniske omrører kan blande mælken, skal omrøringen ske manuelt.

4.2.3. Prøveudtagning fra vejebeholder

Det er vigtigt, at mælken er tilstrækkeligt blandet, når den hældes over i en vejebeholder. Det kan være nødvendigt at omrøre mælken yderligere enten manuelt eller mekanisk for at sikre en jævn fedtfordeling. Når mælkemængder, hvoraf der skal tages prøve, overstiger vejebeholderens kapacitet, udtages en prøve, der er repræsentativ for hele partiet i overensstemmelse med punkt 4.2.4.

4.2.4. Prøveudtagning af mælk, der er fordelt på flere beholdere

Når der skal udtages prøve af mælk, der er fordelt på mere end én beholder, tages en repræsentativ mængde fra hver beholder, og det noteres, hvor meget mælk de respektive prøver er udtaget af. Medmindre prøverne fra hver beholder skal undersøges enkeltvis, blandes portioner af disse repræsentative mængder i forhold til mængden i beholderen, hvorfra hver prøve er taget. Der udtages prøve(r) fra disse samlede forholdsmæssige mængder efter blanding.

4.2.5. Prøveudtagning fra store beholdere, opbevarings-, jernbane- og lastvognstanke

4.2.5.1. Mælken blandes efter en egnet metode før prøveudtagningen

Det anbefales at omrøre mælken mekanisk for at blande indholdet i store beholdere eller opbevarings-, jernbane- eller lastvognstanke (4.2.5.2).

Blandingstidens længde skal være afpasset efter, hvor længe mælken har været i ro. Den blandingstype, der anvendes under givne omstændigheder, skal påvises at være egnet til den planlagte analyse. Kriteriet for blandingseffektiviteten har særlig betydning for ligheden mellem analyseresultater fra prøver, der er udtaget fra enten forskellige dele af partiet eller med mellemrum fra tankens åbning under udstømningen. En metode til blanding af mælk anses for at være effektiv, hvis forskellen i fedtindholdet mellem to prøver, der er udtaget under disse betingelser, er under 0,1 %.

I en stor beholder med åbning i bunden kan der ved åbningsstudsens være en lille mængde mælk, som ikke er repræsentativ for hele indholdet, selv efter blanding. Prøver skal derfor helst tages gennem et mandehul. Hvis der tages prøver fra åbningen, skal der udledes en tilstrækkelig mængde mælk til at sikre, at prøverne er repræsentative for helheden.

4.2.5.2. Blanding af indholdet i store beholdere eller opbevarings-, jernbane- eller lastvognstanke kan udføres:

- af en mekanisk omrører, som er indbygget i tanken og drevet af en elektromotor
- af en propel eller omrører drevet af en elektromotor og placeret på mandehullet med omrøreren nede i mælken
- i jernbane- eller lastvognstanke ved recirkulation af mælken gennem overførselsslangen, der er fastgjort til lænsepumperne og indført gennem mandehullet
- af ren filtreret trykluft. I dette tilfælde skal der benyttes mindst muligt lufttryk for at forhindre udvikling af en harsk smag.

4.3. Automatisk eller halvautomatisk prøveudtagning

Automatiske eller halvautomatiske prøveudtagningsinstrumenter til prøveudtagning af rå mælk fra leverandøren kan benyttes i henhold til kontrollaboratoriets eller anden kompetent myndigheds anvisninger.

Sådant udstyr skal, inden det benyttes og regelmæssigt under brugen, gennemgå relevante prøver som foreskrevet af den ansvarlige myndighed. Prøveudtagningsmetodernes egnethed skal bekræftes med henblik på at fastlægge:

- minimumsvolumen af indsamlet mælk, hvoraf der må udtages prøver
- eventuelt overslæb (som er afhængigt af prøvens minimumsvolumen)
- muligheden for at opnå en repræsentativ prøve af mælken efter korrekt omrøring.

Til anvendelse af automatisk eller halvautomatisk prøveudtagningsudstyr kan den ansvarlige kompetente nationale myndighed foreskrive:

- minimumsvolumen af mælk, hvoraf der må udtages prøver
- minimumsvolumen af prøven
- maksimalt overslæb
- hvilke analyser der kan udføres, og hvilke sikkerhedsforanstaltninger der skal træffes.

4.4. *Prøveudtagning af varmebehandlet mælk til direkte konsum i forbrugerpakninger*

Prøver af varmebehandlet mælk til direkte konsum i forbrugerpakninger skal udtages af den komplette, ubrudte pakning. Hvis det er muligt, udtages prøverne fra påfyldningsmaskinen i forarbejdningsevirsomheden så hurtigt som muligt efter fremstillingen. Med hensyn til pasteuriseret mælk skal udtagningen ske på fremstillingsdagen.

Prøverne udtages fra hver type varmebehandlet mælk (pasteuriseret, UHT og steriliseret) i et antal, som svarer til de undersøgelser, der skal foretages, og i overensstemmelse med kontrollaboratoriets eller anden kompetent myndigheds anvisninger.

5. Identifikation af prøven

Prøven (se 2) skal mærkes med en identifikationskode, således at den nemt kan identificeres ved hjælp af kontrollaboratoriets eller den kompetente myndigheds anvisninger.

6. Transport og opbevaring af prøver

Anvisninger vedrørende transport, opbevaring og tidsinterval mellem prøveudtagning og analyse af mælken udarbejdes af kontrollaboratoriet alt efter mælketype og den analysemetode, der vil blive anvendt. Anvisningerne fastlægges i forståelse med den kompetente nationale myndighed.

Anvisningerne omfatter følgende punkter:

- Under transport og opbevaring skal der træffes sikkerhedsforanstaltninger for at hindre, at mælken udsættes for forurenende lugte og direkte sollys. Hvis der anvendes en gennemsigtig beholder til prøverne, skal denne opbevares mørkt.
- Prøver af rå mælk, der er udtaget med henblik på mikrobiologisk analyse, skal transporteres og opbevares mellem 0 og 4 °C. Tidsintervallet mellem prøveudtagning og analyse skal være så kort som muligt og under alle omstændigheder højst 36 timer. Den kompetente myndighed kan acceptere en opbevaringstemperatur mellem 0 og 6 °C, hvis tidsintervallet mellem prøveudtagning og analyse højst er 24 timer.
- Prøver af pasteuriseret mælk, der er udtaget med henblik på mikrobiologisk analyse, skal transporteres og opbevares mellem 0 og 4 °C. Tidsintervallet mellem prøveudtagning og analyse skal være så kort som muligt og under alle omstændigheder højst 24 timer.
- Prøver af anden mælk end rå mælk og pasteuriseret mælk, der udtages med henblik på mikrobiologisk analyse, skal opbevares nedkølet i laboratoriet, og tidsintervallet mellem prøveudtagning og analyse skal være så kort som muligt.

Særlige sikkerhedsforanstaltninger, der skal træffes i forbindelse med visse former for analyse, er angivet under de forskellige metoder.

BILAG II

INDHOLDSFORTEGNELSE

	<i>Side</i>
I. Bestemmelse af frysepunkt	10
II. Bestemmelse af fosfataseaktivitet	16
III. Bestemmelse af peroxidaseaktivitet	19
IV. Tælling af mikroorganismer — Kimtal ved 30 °C	20
V. Tælling af mikroorganismer — Kimtal ved 21 °C	25
VI. Tælling af coliforme bakterier — Kolonier ved 30° C	29
VII. Tælling af somatiske celler	33
VIII. Påvisning af antibiotika og sulfonamider	39
IX. Påvisning af patogene mikroorganismer	48

I. BESTEMMELSE AF FRYSEPUNKT

1. Omfang og anvendelsesområde

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til bestemmelse af frysepunktet for rå, pasteuriseret, UHT-behandlet og steriliseret sødmælk, delvis skummetmælk og skummetmælk ved hjælp af et apparat (termistorkryoskop), hvori termostatvandet afkøles elektrisk, og hvor en termistorsonde erstatter kviksølvtermometeret.

Der findes to typer instrumenter. Det første er et instrument, som søger det højeste frysepunkt på frysekurvens »plateau«, mens det andet instrument af kommercielle årsager er indstillet til at aflæse på et bestemt punkt, efter at frysningen er begyndt. Da frysekurverne kan være forskellige for forskellige typer mælk samt for mælk og standardopløsninger, som benyttes til kalibreringen, kræver denne referencemetode brug af en plateausøger. Fasttidsinstrumenter kan benyttes til rutinemålinger.

Frysepunktet benyttes til at bestemme mængden af fremmed vand i mælken, forudsat at prøvens surhedsgrad ikke overstiger 0,18 g mælkesyre pr. 100 ml (jf. 7.4).

2. Definition

Mælks frysepunkt: Værdien opnås ved måling i overensstemmelse med den beskrevne metodik og udtrykkes i grader celcius (°C).

3. Princip

En analyseprøve af mælk underafkøles til den rette temperatur afhængigt af instrumentet, og krystalliseringen sættes i gang ved mekanisk vibration, som får temperaturen til at stige hurtigt til et plateau, som svarer til prøvens frysepunkt.

Instrumentet kalibreres ved justering til at vise korrekte aflæsninger for to standardopløsninger ved samme metode som for mælkeprøver. Under disse omstændigheder viser plateauet mælkens frysepunkt i grader celcius.

4. Apparatur og glasvarer

Sædvanligt laboratorieudstyr og i særdeleshed:

4.1. Kryoskop

Kryoskopet består af et termostatstyret kølebad, termistorsonde (et halvleder-modstandstermometer) med tilknyttet kredsløb og et galvanometer eller et display, prøveomrører og en indretning til at starte frysningen samt prøveglas.

4.1.1. Kølebad

Der kan benyttes to typer kølebad.

4.1.1.1. Neddypningstypen

Et velisoleret bad, der indeholder en egnet kølevæske, som omrøres, således at temperaturforskellen mellem to vilkårlige punkter i væsken ikke overstiger 0,2 °C. Væskens temperatur må ikke svinge med mere end $\pm 0,5$ °C i forhold til den nominelle værdi, som er angivet af fabrikanten.

Det er vigtigt, at væsken i kølebadet holdes på et konstant niveau. Hele prøveglasets overflade under volumenmærket skal være dækket af kølevæske.

4.1.1.2. Cirkulationstypen

En stadig strøm af egnet kølevæske cirkuleres i prøveglasets. Væskens temperatur må ikke svinge med mere end $\pm 0,5$ °C i forhold til den nominelle værdi, som er angivet af fabrikanten.

En egnet kølevæske er en 33 % (v/v) vandig opløsning af etan 1,2 diol (etylenglykol).

4.1.2. Termistor og tilhørende kredsløb

Termistoren skal være af glassondetypen med en diameter på højst $1,80 \pm 0,2$ mm og med en kuglediameter på højst 0,31 mm. Termistorens tidskonstant skal være på under to sekunder, og værdien af β (se NB) skal være høj. Driftsspændingen, strøm- og strømtabskonstanten skal sikre, at termistortemperaturen ikke hæves med mere end $0,0005$ °C over omgivelserne ved $-0,512$ °C. Maksimal tolerance på modstanden skal være $\pm 5\%$.

Når sonden er i arbejdsstilling i kryptoskopet, skal spidsen af glasperlen ligge i prøveglassets akse i et punkt, der er $44,6 \pm 0,1$ mm under glassets kant (se figuren på side 15). Brugeren skal have en skabelon, således at sonden kan placeres i denne position.

NB:

β definerer termistorens modstandstemperaturkarakteristik ved formlen:

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

hvor:

T er temperaturen i kelvin

R er modstanden i ohm ved temperaturen T

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \text{er temperaturkoefficienten}$$

β er en konstant, som afhænger af det materiale, termistoren er lavet af. Der anbefales en værdi på over 3 000.

4.1.3. Måle- og aflæsningsinstrument

4.1.3.1. Målingsprincip

Det anvendte instrument skal fungere efter princippet for søgning af det første »plateau« på frysepunktskurven. Plateauet er den del af kurven, hvor temperaturen er konstant inden for $\pm 0,002$ °C i mindst 20 sekunder.

4.1.3.2. Manuel betjening

Termistorens modstand afbalanceres ved hjælp af en wheatstonebro eller et lignende instrument, hvor der benyttes stabile modstande af højeste kvalitet, hvis tolerance ikke er større end $\pm 10\%$, og hvis temperaturkoefficient ikke overstiger 2×10^{-5} pr. grad celsius.

Den variable (balance) modstand må ikke afvige fra lineariteten i hele sin udstrækning med mere end $0,3\%$ af maksimumsværdien.

Det skal være muligt at justere modstandene i kalibreringsøjemed.

Måleskalaen skal gradueres i intervaller på ikke over $0,001$ °C.

4.1.3.3. Automatisk betjening

Måleinstrumentet skal have en aflæsningsnøjagtighed på mindst $0,001$ °C på skalaen 0 til -1 °C.

Måleinstrumentets og det tilhørende kredsløbs stabilitet skal være af en sådan art, at på hinanden følgende indikationer af den samme temperatur ikke svinger med mere end $0,001$ °C.

Kredsløbets linearitet skal være af en sådan art, at der ikke opstår en fejl på mere end $\pm 0,001$ °C på noget punkt inden for skalaen $-0,400$ °C til $-0,600$ °C, når instrumentet betjenes korrekt.

4.1.4. Røretråd

Der benyttes en røretråd af metal med en diameter på $1-1,5$ mm, som er inert over for mælk, til at røre i analyseprøven.

Røretrådens amplitude skal kunne justeres, og den monteres vertikalt med den nederste ende på niveau med termistorsondens spids. En tolerance på ca. $1,5$ mm over eller under denne position er tilladt.

Røretråden skal vibrere lateralt med en tilstrækkelig amplitude angivet af fabrikanten (ikke under $\pm 1,5$ mm) for at sikre, at temperaturen i analyseprøven forbliver ensartet under bestemmelsen. På intet tidspunkt under den normale omrøring må røretråden ramme termistorsonden eller glassets væg.

- 4.1.5. **Instrument til start af frysning**
 Dette kan være en vilkårlig indretning, som straks, når den betjenes, starter frysning af prøven, således at analyseprøvens temperatur stiger mod frysepunktet. Røretråden kan benyttes til dette formål. En metode er at øge svingningsbredden i 1-2 sekunder, således at røretråden rammer prøveglasets væg.
- 4.1.6. **Prøveglas**
 Prøveglassene (se fig. 1) skal være af glas og $50,8 \pm 0,1$ mm lange, $16,0 \pm 0,1$ mm i udvendig diameter og $13,5 \pm 0,1$ mm i indvendig diameter. Vægtykkelsen i hele glasset må ikke afvige med mere end 0,1 mm.
 Glassene skal have et volumenmærke 29,8 mm fra den øverste kant (21 mm over glassets bund) for at angive et prøvevolumen på $2,5 \pm 0,1$ ml.
- 4.1.7. **Elektricitetsforsyning**
 Spændingen skal stabiliseres enten i apparatet eller eksternt, således at svingningen ikke overstiger $\pm 1\%$ af den nominelle værdi, når forsyningen fra lysnettet svinger med $\pm 6\%$.
- 4.2. **Analysevægt**
- 4.3. **Måleflasker med ét mærke, kapacitet 1 000 ml, klasse A.**
- 4.4. **Tørreovn, velventileret, som kan holde en temperatur på 130 ± 1 °C**
 eller
 elektrisk ovn, ventileret, som kan holde en temperatur på 300 ± 25 °C.
- 4.5. **Ekssikkator**
5. **Reagenser**
- 5.1. **Borsilikatglasdestilleret vand, kogt og afkølet til 20 ± 2 °C i en kolbe med kuldioxidabsorptionsrør.**
- 5.2. **Natriumklorid, analysereagenskvalitet, fintmalet, tørret i fem timer ved 300 ± 25 °C i en ovn eller alternativt tørret i en ovn ved 130 ± 1 °C i mindst 24 timer og afkølet til stuetemperatur i en effektiv ekssikkator.**
- 5.3. **Fremstilling af standardopløsninger**
 Et passende kvantum (se tabel 1) tør natriumklorid (5.2) afvejes i en vejeflaske. Det opløses i destilleret vand (5.1), overføres kvantitativt til en 1 000 ml måleflaske med ét mærke og fortyndes til mærket med vand ved 20 ± 2 °C.
 Opbevares ved ca. 5 °C i polyetylenflasker med tætsluttende låg med en kapacitet, der ikke overstiger 250 ml, i højst to måneder.

Tabel 1 – Frysepunkt for natriumkloridopløsninger ved 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

Inden en standardopløsning benyttes, vendes og drejes flasken forsigtigt flere gange, så indholdet blandes grundigt. En standardopløsning må på intet tidspunkt bevæges så kraftigt, at der kommer luft ind.

Der udtages prøver af en standardopløsning fra flasken ved overhældning af opløsning i et rent, tørt bægerglas, dvs. der må aldrig benyttes pipetter til dette formål.

Der må ikke bruges opløsninger fra flasker, der er mindre end kvart fyldte, og hvis de ikke er konserveret med et fungicid (f.eks. tiomersalopløsning 10 g/l), må de ikke benyttes, hvis de er over to måneder gamle.

6. Kalibrering af termistorkryoskop

Kryoskopet skal etableres således, at temperaturen i den omgivende luft ikke afviger mere end 1 °C fra den temperatur, hvor kalibreringen foretages. Kryoskopet må ikke udsættes for sollys, træk eller temperaturer over 26-27 °C.

Det må kontrolleres, at kryoskopet fungerer tilfredsstillende ifølge brugsanvisningen, og at der tændes for det mindst 12 timer før kalibreringen. Sondens position, røretrådets amplitude samt kølevæskernes temperatur kontrolleres.

Der vælges to standardopløsninger (se tabel 1), som ligger tæt op ad den forventede værdi af frysepunktet for de mælkeprøver, der skal kontrolleres. Forskellen mellem de to opløsningers frysepunkt må helst ikke være mindre end - 0,100 °C.

(I visse udformninger af de kryoskoper, der fås i handelen, er kredsløbet, som er forbundet med termistoren, konstrueret, så det balancerer ved et bestemt frysepunkt på instrumentets måleskala. I sådanne tilfælde lettes kalibreringen ved brug af en standardopløsning med dette frysepunkt som en af kalibreringsopløsningerne, og fabrikanten skal angive denne værdi).

2,5 ± 0,1 ml af én standard pipetteres i et rent, tørt prøveglas, og kryoskopet betjenes.

NB:

Prøveglassene, der benyttes under kalibreringen, skal være af samme type glas og vaskes og skylles med demineraliseret vand på samme tid som de glas, der benyttes til kontrol af mælkeprøverne. Standardopløsningernes temperaturer skal svare til mælkeprøvernes temperaturer.

Kalibreringskontrollerne justeres ifølge brugsanvisningen, indtil kryoskopmålingen svarer til standardopløsningens frysepunkt. Dette gentages med den anden standardopløsning, og der fortsættes med skiftevis den ene og den anden opløsning, indtil flere på hinanden følgende målinger for hver opløsning uden yderligere justering af kalibreringskontrollerne viser den korrekte værdi af hver opløsningens frysepunkt. Kryoskopet er nu klar til brug og vil direkte uden nogen korrektion angive mælkeprøvens frysepunkt.

7. Forbehandling af prøven

7.1. Om nødvendigt opbevares prøver ved en temperatur på 0-5 °C.

7.2. Synlige fremmedlegemer eller fast mælkefedt fra prøven fjernes eventuelt ved filtrering over i en ren, tør beholder, og prøven blandes forsigtigt. Hvis der benyttes filter, skal det være inert over for mælk, og det skal være effektivt, når det benyttes ved laboratorietemperatur.

7.3. Mælken kan kontrolleres ved opbevaringstemperatur (0-5 °C) eller ved laboratorietemperatur straks før prøvens påbegyndelse. Det er dog nødvendigt, at standardopløsningerne og mælkeprøverne har samme temperatur ved brug.

7.4. Mælkens titrerbare surhedsgrad bestemmes så sent som muligt før frysepunktundersøgelsen. Prøver med en surhedsgrad på over 0,18 g mælkesyre pr. 100 ml mælk kan ikke undersøges.

7.5. UHT-behandlet og steriliseret mælk skal henstå i mindst 20 minutter i en åben beholder før undersøgelse.

8. Metodik

8.1. Indledende kontrol

Det kontrolleres, at kølevæskens niveau og temperatur er i overensstemmelse med brugsanvisningen, og om nødvendigt, at termistorsonden er i et tomt prøveglas i prøvebrønden. Der tændes for kryoskopet, og det kontrolleres, at kølevæsken omrøres eller cirkuleres korrekt. Når kryoskopet har været tændt i mindst 12 timer, kontrolleres kølevæskens temperatur og røretrådens position og amplitude.

8.2. Rutinekalibreringskontrol

Før hver prøverække måles en standardnatriumkloridopløsnings frysepunkt (f.eks. en opløsning med frysepunkt på $-0,512$ °C), indtil to på hinanden følgende bestemmelser ikke afviger med mere end $0,001$ °C. Hvis middelværdien afviger med mere end $0,002$ °C fra standardopløsningens frysepunkt, recalibreres kryoskopet som beskrevet i punkt 6.

Hvis kryoskopet benyttes løbende, foretages rutinekalibreringskontrollen mindst én gang i timen ved at følge brugsanvisningen.

8.3. Bestemmelse af mælkens frysepunkt

Mælkeprøveflasken vendes og drejes forsigtigt flere gange for at blande indholdet. En prøve må på intet tidspunkt bevæges så kraftigt, at der kommer luft ind.

$2,5 \pm 0,1$ ml af mælken pipetteres i et rent, tørt prøveglas, og eventuelt overskud fjernes med en pipette. Det kontrolleres, at sonden og røretråden er rene og tørre, eventuelt ved omhyggelig aftørring med en blød, ren, fnugfri klud nedefra og opefter.

Prøveglasset indsættes i det kalibrerede kryoskop ifølge brugsanvisningen. Mælken afkøles, og frysningen startes ved en af fabrikanten angivet temperatur $\pm 0,1$ °C.

(På visse automatiske instrumenter kan denne temperatur iagttages på den digitale display. På manuelle instrumenter opnås den nødvendige præcision ved at sikre, at frysningen starter, når galvanometret viser den rigtige temperatur).

Hvis frysning af en eller anden grund startes før eller efter den angivne temperatur, opgives prøven, og der gentages med en anden mælkeportion. Hvis også den gentagne prøve fryser før den angivne temperatur, opvarmes endnu en prøveportion til 45 °C og holdes der i fem minutter, så krystallinsk fedt kan smelte.

Den nedkøles derefter til prøvetemperaturen og undersøges straks. Mælkens temperatur stiger hurtigt, efter at frysningen starter, til en værdi, som forbliver praktisk taget konstant i nogen tid, før den falder igen. Frysepunktet svarer til den højeste temperatur, der er nået i denne periode, og denne værdi registreres.

NB:

Den tid, hvori temperaturen er konstant, og tidsintervallet mellem frysningens start og opnåelse af den højeste temperatur, varierer fra prøve til prøve og vil være betydeligt kortere for vand og standardnatriumkloridopløsninger end for mælk. Det er vigtigt, at det er den højeste temperatur, der registreres.

Når målingen er afsluttet tilfredsstillende, fjernes glasset og skylles med vand, hvorefter termistorsonden og røretråden aftørres med en blød, ren, fnugfri klud nedefra og opefter, og der foretages en tilsvarende bestemmelse af en anden portion af mælkeprøven.

Hvis forskellen mellem de konstaterede frysepunkter er større end værdien af repeterbarheden ($0,004$ °C), foretages en dobbeltbestemmelse af en anden portion af prøven. Stemmer de to bestemmelser overens ved nær $0,004$ °C, registreres værdierne og benyttes til beregning af det endelige resultat.

8.4. Afkøling af sonde

Efter brug af instrumentet placeres et tomt prøveglas i prøvebrønden, og betjeningshovedet nedsænkes, så sonden holdes afkølet. (I visse udformninger af kryoskoper er dette måske ikke muligt. I så fald er det vigtigt at kontrollere, at sonden er tilstrækkelig afkølet, før der tages målinger, f.eks. ved at foretage flere forsøgsbestemmelser, indtil der opnås konsistente målinger).

9. Angivelse af resultater

9.1. Beregning

Hvis kalibreringen bekræftes efter rutinekalibreringskontrollen, beregnes middelværdierne af de acceptable dobbeltfrysepunktsbestemmelser afrundet til tre decimaler.

Hvis summen af to acceptable dobbeltbestemmelser er et ulige tal, afrundes middelværdien til det nærmeste lige tal som vist i følgende eksempel:

Frysepunkt (° C)

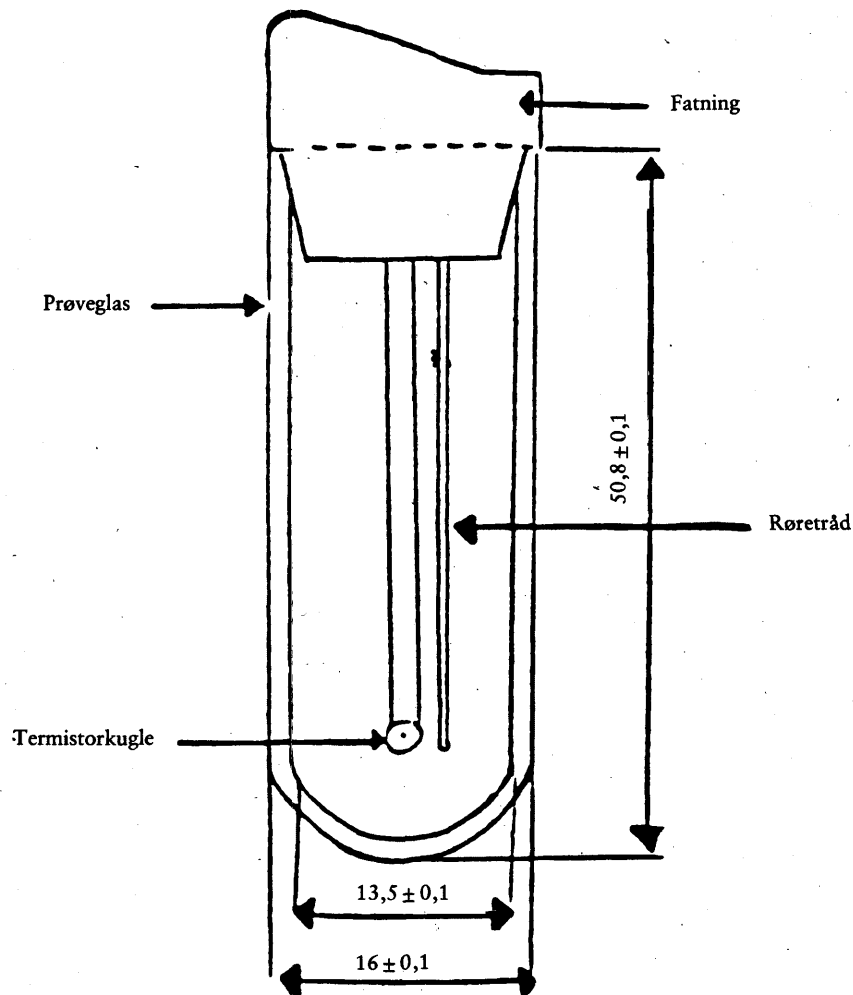
Dobbeltbestemmelser		Middelværdi
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

9.2. Nøjagighed

9.2.1. Repeterbarhed (r): 0,004° C.

9.2.2. Reproducerbarhed (R): 0,006° C.

Detailtegnning af termistorkryoskop 4.1 (placering af prøveglas i forhold til termistorkugle og røretråd)



Alle dimensioner i mm

II. BESTEMMELSE AF FOSFATASEAKTIVITET

1. **Omfang og anvendelsesområde**

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til bestemmelse af fosfataseaktiviteten i pasteuriseret mælk.

2. **Definition**

2.1. *Fosfataseaktiviteten* er et mål for mængden af aktiv, alkalisk fosfatase i produktet udtrykt som mængden af fenol i mikrogram, der frigøres af 1 ml af den pasteuriserede mælk under betingelser, der er nævnt i metoden.

2.2. Mælk, hvis fosfataseaktivitet er under 4 µg/ml, anses for at være fosfataseaktiv.

3. **Princip**

Fosfataseaktiviteten bestemmes på grundlag af mængden af fenol, der frigøres fra det dinatrium-fenylfosfat, som tilsættes prøven. Den frigjorte fenol reagerer med dibromkinonklorimid og danner dibromindofenol (blålig), som måles kolorimetrisk ved 610 nm. Der foretages en sammenligning med en prøve, hvor fosfataseenzymet er ødelagt.

4. **Reagenser**4.1. *Bariumborathydroxid-buffer*

4.1.1. 50,0 g bariumhydroxid ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) opløses i vand til højst 1 000 ml.

4.1.2. 22,0 g borsyre (H_3BO_3) opløses i vand til højst 1 000 ml.

4.1.3. 500 ml af hver opløsning opvarmes til 50 °C, opløsningerne blandes, omrøres, afkøles hurtigt til ca. 20 °C, og om nødvendigt justeres pH-værdien til $10,6 \pm 0,1$ ved tilsætning af opløsning 4.1.1 eller 4.1.2. Opløsningen filtreres. Opløsningen opbevares i en beholder med tætsluttende låg.

4.1.4. Opløsningen fortyndes inden brug med en tilsvarende mængde vand.

4.2. *Farveudviklingsbuffer*

6,0 g natriummetaborat (NaBO_2) eller 12,6 g $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ samt 20,0 g natriumklorid (NaCl) opløses i vand til højst 1 000 ml.

4.3. *Farvefortyndingsbuffer*

10 ml af farveudviklings-bufferen (4.2) fortyndes med vand til 100 ml.

4.4. *Buffersubstrat*

0,1 g fenolfrit dinatriumfenylfosfatdehydrat opløses i 100 ml buffer (4.1.3) eller 0,5 g dinatrium-fenylfosfat opløses i 4,5 ml farveudviklings-buffer (4.2), to dråber BKK-opløsning (4.6) tilsættes, og opløsningen henstår ved stuetemperatur i 30 minutter. Den således dannede farve ekstraheres med 2,5 ml butan-1-ol og henstår, indtil butan-1-ol udskilles. Butan-1-ol fjernes og kasseres. Denne ekstraktion gentages eventuelt.

Opløsningen kan opbevares i køleskab i et par døgn. Farven udvikles og reekstraheres før brug. Buffer-substratet fremstilles umiddelbart før brug ved fortynding af 1 ml af denne opløsning til 100 ml med bariumborathydroxid-buffer (4.1.3).

4.5. *Zink-kobber fældningsmiddel*

3,0 g zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) og 0,6 g kobber (II) sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) opløses i vand til 100 ml.

4.6. *2,6-dibromkinonklorimidopløsning (BKK-opløsning)*

40 ± 1 mg 2,6-dibromkinonklorimidopløsning (BKK) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) opløses i 10 ml 96 % (v/v) ethanol.

Opløsningen opbevares i en brun flaske i køleskab. Den kasseres, hvis den misfarves eller er over en måned gammel.

4.7. *Kobber (II) sulfatopløsning*

0,05 g kobber (II) sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) opløses i vand til 100 ml.

4.8. *Standardfenolopløsninger*

4.8.1. 200 mg \pm 2 mg ren, vandfri fenol vejes og overføres til en 100 ml måleflaske; der tilsættes vand, blandes og fyldes op til mærket. Denne stamopløsning forbliver stabil i flere måneder, når den opbevares i køleskab.

4.8.2. 10 ml stamopløsning fortyndes til 100 ml med vand og blandes. 1 ml indeholder 200 μ g fenol.

5. **Apparatur og glasvarer**

NB:

- a) Alle glasvarer, propper og prøveudtagningsredskaber skal rengøres omhyggeligt. Det anbefales at skylle dem med nykogt, destilleret vand eller at dampe dem.
- b) Visse typer plastikpropper kan give fenolforurening, og sådanne må ikke benyttes.

Sædvanligt laboratorieudstyr og i særdeleshed:

5.1. *Analysevægt*

5.2. *Vandbad*, som kan holdes på 37 ± 1 °C.

5.3. *Spektrofotometer*, egnet til målinger ved en bølgelængde på 610 nm.

5.4. *Reagensglas*, 16 eller 18 mm \times 150 mm, helst graduert ved 5 og 10 ml.

5.5. *Pipetter*

5.6. *Glastragte* i passende størrelse, f.eks. med 5 cm diameter.

5.7. *Foldefiltre* på mindst 9 cm i diameter til middel filtreringshastighed.

5.8. *Målekolber* til fremstilling af standardopløsninger.

6. **Metodik**

NB:

- a) Man skal undgå sollys under bestemmelsen.
- b) Forurening med spor af spyt eller sved kan give falske positive resultater og skal undgås. I den forbindelse skal man være særlig opmærksom på pipetteringer.

6.1. *Forbehandling af prøven*

6.1.1. Analysen foretages umiddelbart efter prøveudtagning. Ellers opbevares prøven i køleskab, dog højst i to døgn.

6.2. *Analyseprøve*

1 ml af prøven pipetteres over i hvert af to reagensglas (5.4). Et glas benyttes til kontrol- eller blindprøve.

6.3. *Bestemmelse*

6.3.1. Blindprøven opvarmes i to minutter i kogende vand. Reagensglasset og bægerglasset med kogende vand tildækkes med aluminiumsfolie for at sikre, at hele glasset opvarmes. Der afkøles hurtigt til stuetemperatur.

6.3.2. Blindprøven og prøven behandles på samme måde i resten af processen. 10 ml buffersubstrat (4.4) tilsættes og der blandes.

- 6.3.3. Prøverne inkuberes straks i vandbadet (5.2) i 60 minutter, idet indholdet af og til blandes (mindst fire gange).
- 6.3.4. Prøverne opvarmes i kogende vand i to minutter på samme måde som anført under 6.3.1. De afkøles hurtigt til stuetemperatur.
- 6.3.5. 1 ml zink-kobber fældningsmiddel (4.5) tilsættes til hvert glas, og der blandes grundigt.
- 6.3.6. Prøverne filtreres gennem tørt filterpapir. De første 2 ml kasseres. Eventuelt filtreres igen, indtil filtratet er helt klart, og der opsamles 5 ml i et reagensglas.
- 6.3.7. 5 ml farveudviklingsbuffer (4.2) tilsættes.
- 6.3.8. 0,1 ml BKK-opløsning (4.6) tilsættes, der blandes, og man lader farven udvikle sig i 30 minutter ved stuetemperatur.
- 6.3.9. Absorbansen i forhold til kontrol- eller blindprøven måles i spektrofotometret (5.3) ved en bølgelængde på 610 nm.
- 6.3.10. Bestemmelsen gentages med en passende fortynding af prøven, hvis absorbansen som målt under 6.3.9 overstiger absorbansen af standardopløsningen, som indeholder 20 µg fenol pr. glas som målt i 6.4.4. Denne fortynding tilberedes ved blanding af et volumen af prøven med et passende volumen af en del af den samme prøve forsigtigt opvarmet til kogepunktet for at inaktivere fosfatasen.
- 6.4. *Udarbejdelse af kalibreringskurven*
- 6.4.1. Der laves en passende skala af fortyndede standarder med udgangspunkt i standardfenol (4.8.2) indeholdende 0 (kontrol- eller blindprøve), 2, 5, 10 og 20 µg fenol pr. milliliter, og der pipetteres henholdsvis 1 ml vand og 1 ml af de fire standardfenolopløsninger over i hvert af de fem reagensglas.
- 6.4.2. Til hvert reagensglas tilsættes 1 ml kobber(II)sulfatopløsning (4.7), 5 ml farvefortyndingsbuffer (4.3), 3 ml vand og 0,1 ml BKK-opløsning (4.6). Der blandes.
- 6.4.3. Man lader farven udvikle sig i 30 minutter ved stuetemperatur.
- 6.4.4. Absorbansen måles i forhold til kontrol- eller blindprøven i spektrofotometeret ved en bølgelængde på 610 nm.
- 6.4.5. På grundlag af absorbansværdierne (6.4.4), som er opnået for hver mængde tilsat fenol (6.4.1), beregnes regressionslinjen efter de mindste kvadraters metode.
7. **Angivelse af resultater**
- 7.1. *Beregning og formel*
- 7.1.1. På grundlag af absorbansmålingen (6.3.9) beregnes mængden af fenol ved hjælp af den opnåede regressionslinje (6.4.5).
- 7.1.2. Fosfataseaktiviteten beregnes som mikrogram fenol pr. milliliter af den pasteuriserede mælk ved følgende formel:
Fosfataseaktivitet = $2,4 \times A \times D$
hvor
A er mængden af fenol i mikrogram opnået under 7.1.1
D er fortyndingsfaktoren for fortyndingen i henhold til 6.3.10 (hvor der ikke sker fortynding, er $D = 1$).
Faktoren 2,4 er fortyndningsfaktoren (2^{12} af 1 ml prøve) — se 6.2 i forbindelse med 6.3.2, 6.3.5 og 6.3.6.
- 7.2. *Nøjagtighed*
- 7.2.1. Repeterbarhed (r): 2 µg fenol/ml.
- 7.2.2. Reproducerbarhed (R): 3 µg (foreløbig) fenol/ml.
- 7.2.3. Hvis en fortynding anvendes ifølge 6.3.10, henviser den i 7.2.1 og 7.2.2 nævnte grænse til de resultater, der er opnået med den fortyndede prøve.

III. BESTEMMELSE AF PEROXIDASEAKTIVITET

1. **Omfang og anvendelsesområde**

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til bestemmelse af tilstedeværelse eller fravær af peroxidaseenzym i mælk til kontrol med pasteuriseringen.

2. **Definition***Peroxidase-positiv reaktion*

Hvis mælken er korrekt pasteuriseret, farves den blå senest 30 sekunder efter iblandingen.

Peroxidase-negativ reaktion

Der sker ikke nogen blåfarvning inden for 30 sekunder efter blandingen.

3. **Princip**

Peroxidaseenzymet nedbryder brintoverilte. Den frigjorte atomare ilt oxiderer det farveløse 1,4-fenylendiamin til det violette indofenol (Storchs prøve). Farveintensiteten er proportional med enzymets koncentration.

4. **Reagenser**4.1. *Opløsning af 1,4-fenylendiamin*

2 g 1,4-fenylendiamin ($C_6H_8N_2$) opløses i varmt vand (50 °C) til et volumen på 100 ml. Opløsningen opbevares køligt og mørkt i en mørkebrun flaske med glasprop. En 1,4-fenylendiaminopløsning danner bundfald i løbet af et til to døgn. Den skal så kasseres.

4.2. *Brintoverilteopløsning*

9 ml brintoverilte 30 % fortyndes i vand til et volumen på 100 ml. 1 ml koncentreret svovlsyre pr. liter opløsning tilsættes til stabilisering.

Brintoverilteopløsningen er stabil i en måned, hvis den opbevares køligt og mørkt i en flaske med glasprop, så den ikke kommer i kontakt med organiske forbindelser.

5. **Metodik**

5.1. 5 ml af mælkeprøven overføres til et rent reagensglas med passende lukning.

5.2. 5 ml 1,4-fenylendiaminopløsning (4.1) tilsættes.

5.3. To dråber brintoverilteopløsning (4.2) tilsættes.

5.4. Man må holde øje med farvereaktionen inden for 30 sekunder efter blanding. Hvis den blå farve fremkommer over 30 sekunder efter tilsætning af reagenserne, er reaktionen uspecifik.

IV. TÆLLING AF MIKROORGANISMER — KIMTAL VED 30 °C

1. **Omfang og anvendelsesområde**

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til tælling af mikroorganismer ved hjælp af en kolonitællingsteknik ved 30 °C.

Denne metode er anvendelig for rå og pasteuriseret mælk samt for UHT-behandlet og steriliseret mælk, der er forinkuberet ved 30 °C i 15 døgn.

2. **Definition**

Ved »mikroorganismer« forstås organismer, som danner tællelige kolonier, når de inkuberes aerobt under de beskrevne betingelser.

3. **Princip**

En defineret mængde af mælkeprøven blandes med næringssubstratet i petriskåle og inkuberes ved 30 °C i 72 timer. Kolonierne tælles, og antallet af mikroorganismer pr. 1 ml rå eller pasteuriseret mælk eller pr. 0,1 ml forinkuberet UHT-behandlet eller steriliseret mælk beregnes.

4. **Apparatur og glasvarer**

Sædvanligt laboratorieudstyr og i særdeleshed:

4.1. *Apparater*

4.1.1. Varmluftsovn, der kan fungere ved 170—175 °C.

4.1.2. Autoklave, der kan fungere ved 121 ± 1 °C.

4.1.3. Varmeskab, der overalt kan holde en temperatur på 30 ± 1 °C.

4.1.4. pH-meter med en nøjagtighed på $\pm 0,1$ pH-enhed med temperaturkompensation.

4.1.5. Vandbad, der kan holde en temperatur på 45 ± 1 °C.

4.1.6. Lup, 2—4 gange forstørrelse.

4.1.7. Lup, 8—10 gange forstørrelse.

4.1.8. Tælleinstrument

4.1.9. Mixer, der kan blande 1 ml mælkeprøve eller tifoldsfortynding med 9 ml fortyndingsvæske, og som fungerer efter princippet for excentrisk rotation af indholdet i reagensglaset.

4.2. *Glasvarer*

4.2.1. Reagensglas med passende lukkeanordninger og tilstrækkelig kapacitet til at indeholde 10 ml af den primære fortynding eller af yderligere tifoldsfortyndinger, idet der samtidig skal være plads nok til at blande.

4.2.2. Flasker med en kapacitet på 150—250 ml eller glas med en kapacitet på ca. 20 ml til opbevaring af næringssubstratet.

4.2.3. Pipetter (med vatprop) af glas eller sterilt, syntetisk materiale med ubeskadiget spids og en nominal kapacitet på 1 ml samt en åbning med en diameter på 1,75—3 mm.

4.2.4. Petriskåle af klart, ufarvet glas eller sterilt, syntetisk materiale. Den nederste skål med en indvendig diameter på ca. 90—100 mm. Den indvendige dybde skal være mindst 10 mm. Bunden skal være uden ujævnheder, som forstyrrer tællingen af kolonier.

4.2.5. *Sterilisation af glasvarer*

Glasvarer steriliseres ved en af følgende metoder:

a) henstand ved 170—175 °C i mindst en time i varmluftsovn (4.1.1)

b) henstand ved 121 ± 1 °C i mindst 20 minutter i autoklave (4.1.2).

Det skal sikres, at der sker tilstrækkelig gennemtrængning af damp i autoklaven; hvis udstyret f.eks. steriliseres i beholdere, skal disse ikke lukkes tæt, og flasker skal have løstsiddende låg.

Glasararer, som steriliseres i autoklaven, tørres ved dampventilation.

Pipetter steriliseres i en varmluftsovn (4.1.1).

5. Dyrkningssubstrat — Milk plate count agar

5.1. *Sammensætning*

Gærekstrakt	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glukose D(+) eller dextrose	1,0 g
Skummetmælkspulver	1,0 g
Agar	10—15 g (afhængigt af den anvendte agars gelatineringssevne)
Vand	1 000 ml.

Skummetmælkspulveret skal være frit for hæmmende stoffer. Dette skal sikres ved sammenlignende undersøgelser, hvor der anvendes skummetmælkspulver, som ikke indeholder hæmmende stoffer.

Fremstilling:

Bestanddelene opslættes og opløses i vand i følgende rækkefølge: gærekstrakt, trypton, glukose og endelig skummetmælkspulver. Opvarmning af opslætningen fremmer denne proces. Agaren tilsættes, og der opvarmes til kogepunktet under stadig omrøring, eller i strømmende vanddamp i ca. 30 minutter indtil agaren er fuldstændig opløst.

Eventuelt filtreres gennem filterpapir.

pH-værdien kontrolleres med et pH-meter (4.1.4) og justeres eventuelt, således at den efter sterilisation er $6,9 \pm 0,1$ ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, idet der benyttes en opløsning (mindst $0,1\text{ mol/l}$) af natriumhydroxid eller saltsyre.

5.2. *Fordeling, sterilisation og opbevaring af næringssubstrat*

Substratet (5.1) fordeles i portioner af 100—150 ml i flasker eller 12—15 ml i glas (4.2.2). Kolberne og glassene tilproppes.

Der steriliseres i autoklave (4.1.2) ved $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 15 minutter.

Substratets pH kontrolleres.

Hvis substratet ikke skal bruges med det samme, opbevares det mørkt ved en temperatur på $1\text{—}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i højst en måned efter fremstillingen.

5.3. *Dehydreret næringssubstrat — kommercielt tilgængeligt*

Næringssubstratet (5.1) kan fremstilles af dehydreret substrat. Brugsanvisningen følges, men skummetmælkspulveret tilsættes inden opløsning, hvis det ikke er en bestanddel.

pH-værdien justeres til $6,9 \pm 0,1$ ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ som beskrevet i 5.1, og substratet fordeles, steriliseres og opbevares som beskrevet i 5.2.

6. Fortyndingsvæske

6.1 *Pepton-/saltopløsning:*

Sammensætning:

Pepton	1,0 g
Natriumklorid (NaCl)	8,5 g
Vand	1 000 ml.

Fremstilling

Bestanddelene opløses i vand, og hvis nødvendigt foretages opvarmning.

pH-værdien kontrolleres med et pH-meter (4.1.4) og justeres eventuelt, således at den efter sterilisation er $7,0 \pm 0,1$ ved $25 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, idet der benyttes en opløsning (mindst $0,1\text{ mol/l}$) af natriumhydroxid eller saltsyre.

- 6.2. *Fordeling, sterilisation og opbevaring af fortyndingsvæske*
- Fortyndingsvæsken (6.1) fordeles i reagensglas (4.2.1) i portioner, således at hvert glas efter sterilisation indeholder $9,0 \pm 0,2$ ml fortyndingsvæske. Glassene tilproppes.
- Der steriliseres i autoklaven (4.1.2) ved 121 ± 1 °C i 15 minutter. Fortyndingsvæskens pH-værdi kontrolleres.
- Hvis fortyndingsvæsken ikke skal bruges med det samme, opbevares den mørkt ved en temperatur på 1—5 °C i højst en måned efter fremstillingen.
- 6.3. *Dehydreret fortyndingsvæske — kommercielt tilgængelig*
- Fortyndingsvæsken (6.1) kan fremstilles af tabletter eller pulvere, som fås i dehydreret form. Brugsanvisningen følges. pH-værdien justeres som beskrevet i 6.1 og fortyndingsvæskerne fordeles, steriliseres og opbevares som beskrevet i 6.2.
7. **Metodik**
- 7.1. *Smeltning af substratet*
- Inden den mikrobiologiske undersøgelse smeltes den nødvendige mængde substrat hurtigt i vandbad (4.1.5) og substratet tempereres til 45 ± 1 °C i vandbad (4.1.5).
- 7.2. *Forbehandling af mælkeprøven*
- Mælkeprøven blandes grundigt, således at mikroorganismene er fordelt så jævnt som muligt, ved at bunden på mælkeprøvebeholderen hurtigt vendes i vejret 25 gange. Undgå skumdannelse eller lad skummet lægge sig. Intervallet mellem blanding og udtagning af analyseprøver må ikke være over 3 minutter.
- 7.3. *Fremstilling af primærfortyndingen (10^{-1}) (rå og pasteuriseret mælk)*
- Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af prøven (7.2) med rå mælk eller pasteuriseret mælk til 9 ml fortyndingsvæske (6.1). Man må undgå kontakt mellem pipetten og fortyndingsvæsken. Fortyndingsvæskens temperatur skal være omtrent den samme som mælkeprøvens. Denne primærfortynding blandes omhyggeligt i mixeren (4.1.9) i 5—10 sekunder.
- Der opnås således en primærfortynding på 10^{-1} .
- 7.4. *Fremstilling af yderligere tifoldsfortyndinger (rå og pasteuriseret mælk)*
- Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af primærfortyndingen (7.3) til 9 ml fortyndingsvæske (6.1) efter angivelserne i punkt 7.3.
- Der opnås således en fortynding på 10^{-2} .
- Dette gentages for at opnå yderligere tifoldsfortyndinger, indtil det rette antal mikroorganismer forventes opnået (8.1.1).
- 7.5. *Podning i petriskålene*
- 7.5.1. Rå mælk: Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af prøven og/eller en passende tifoldsfortynding til en skål (4.2.4). Der skal undersøges mindst to fortyndinger. Der tilberedes en skål med hver valgt fortynding (8.1.1).
- 7.5.2. Pasteuriseret mælk: Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af prøven og/eller en passende tifoldsfortynding til en skål (4.2.4). Der skal undersøges mindst to fortyndinger. Der tilberedes to skåle af hver valgt fortynding (8.1.1).
- 7.5.3. UHT-behandlet og steriliseret mælk (undersøgt efter inkubation i 15 dage ved 30 °C — Direktiv 85/397/EØF, bilag A, kapitel VII, punkt 5):
- Med en steril pipette (4.2.3) overføres 0,1 ml af mælkeprøven (7.2) til en skål (4.2.4). Der tilberedes to skåle.

7.6. *Ophældning*

Ca. 15—18 ml af substratet (7.1) ophældes i hver podet skål.

Straks efter ophældningen blandes der ved drejning af petriskålen tilstrækkeligt til at opnå jævnt dispergerende kolonier efter inkubation.

Der må højst gå 15 minutter mellem afslutningen af fremstillingen af mælkeprøven og, alt efter mælketype, blandingen af analyseprøven eller fortyndingen med substratet.

Man lader substratet størkne på en ren, kølig, vandret flade.

7.7. *Inkubation af petriskåle*

Skålene stilles i varmeskabet (4.1.3). De inkuberes med lågene nedad. Der må ikke stilles mere end seks oven på hinanden. Stakkene af skåle må ikke røre hinanden eller varmeskabets sider.

Der inkuberes ved 30 ± 1 °C i 72 ± 2 timer.

7.8. *Tælling af kolonier*

Kolonierne i de petriskåle, der indeholder højst 300 kolonier, tælles.

Skålene undersøges i dæmpet belysning. Der kan for at lette tællingen benyttes en egnet lup (4.1.6) og/eller et tælleinstrument (4.1.8). Bundfaldspartikler i skålene må ikke forveksles med enkeltkolonier. Tvivlsobjekter undersøges omhyggeligt med en kraftigere lup (4.1.7), når det er nødvendigt for at skelne kolonier fra fremmede stoffer.

Spredningskolonier betragtes som enkeltkolonier. Hvis mindre end en fjerdedel af skålen er overgroet med spredningskolonier, tælles kolonierne på den del af skålen, som ikke er berørt, og det tilsvarende tal beregnes for hele skålen. Hvis mere end en fjerdedel af skålen er overgroet med spredningskolonier, kasseres skålen.

8. **Beregning og angivelse af resultater**8.1. *Rå og pasteuriseret mælk*

8.1.1. Der bruges tal fra alle skåle, som indeholder 10—300 kolonier (se 8.1.3 og 8.1.4).

8.1.2. Antallet af mikroorganismer pr. 1 ml rå eller pasteuriseret mælk angives ved formelen:

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

hvor

ΣC er summen af kolonier talt som i 8.1.1

$(n_1 + 0,1 n_2) d$ svarer til volumen af den talte prøve, hvor:

n_1 er antallet af skåle, der er talt i første fortynding

n_2 er antallet af skåle, der er talt i anden fortynding

d er fortyndingsfaktoren, som lå til grund for de første tællinger.

Tallet afrundes til to betydende cifre. Når cifret, der skal afrundes, er 5, afrundes det, således at tallet umiddelbart til venstre er lige.

Eksempel (pasteuriseret mælk):

Fortynding 10^{-2} : 278 og 290 kolonier

Fortynding 10^{-3} : 33 og 28 kolonier

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

$$= \frac{629}{0,022}$$

$$= 28\,590$$

$$= 29\,000$$

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

- 8.1.3. Hvis der kun er tal på under 10, registreres antallet af mikroorganismer pr. ml som »mindre end $10 \times d$ pr. ml«, hvor »d« er det reciproke tal til den laveste fortyndingsfaktor.
- 8.1.4. Hvis der kun er tal på over 300, men tælling er mulig, beregnes et skønnet tal på grundlag af skåle med de tal, der kommer nærmest på 300 kolonier, og dette ganges med det reciproke tal til fortyndingsfaktoren. Resultatet registreres som »skønnet antal mikroorganismer pr. ml«.
- 8.2. *UHT-behandlet og steriliseret mælk*
- Kimtal på over 10 kolonier pr. 0,1 ml anses for ikke længere at opfylde kravene i direktiv 85/397/EØF.
9. **Nøjagtighed**
- Der foreligger endnu ikke resultater af internationalt godkendte sammenlignende undersøgelser.

V. TÆLLING AF MIKROORGANISMER — KIMTAL VED 21 °C

1. **Omfang og anvendelsesområde**

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til optælling af mikroorganismer ved en kolonitællingsteknik ved 21 °C på pasteuriseret mælk efter inkubation af mælken ved 6 °C i fem dage for at bestemme graden af kontaminering af den pasteuriserede mælk med psykrotrofe mikroorganismer, der kan formere sig i mælk ved 6 °C.

2. **Definition**

Ved »mikroorganismer« forstås organismer, der danner tællelige kolonier, når de inkuberes aerobt under de beskrevne betingelser.

3. **Princip**

Den pasteuriserede mælk inkuberes ved 6 °C i fem døgn. En defineret mængde af mælkeprøven blandes med næringssubstratet i petriskåle og inkuberes ved 21 °C i 25 timer. Kolonierne optælles, og antallet af mikroorganismer pr. 1 ml pasteuriseret mælk beregnes.

4. **Apparatur og glasvarer**

Sædvanligt laboratorieudstyr og i særdeleshed:

4.1. **Apparatur**

4.1.1. Varmluftsovn, der kan fungere ved 170—175 °C.

4.1.2. Autoklave, der kan fungere ved 121 ± 1 °C.

4.1.3. Varmeskab, der overalt kan holde en temperatur på

a) $6 \pm 0,2$ °C

b) 21 ± 1 °C.

4.1.4. pH-meter med en nøjagtighed på $\pm 0,1$ pH-enhed, med temperaturkompensation.

4.1.5. Vandbad, der kan holde en temperatur på 45 ± 1 °C.

4.1.6. Lup, 2—4 gange forstørrelse.

4.1.7. Lup, 8—10 gange forstørrelse.

4.1.8. Tælleinstrument.

4.1.9. Mixer, der kan blande 1 ml af mælkeprøven eller tifoldsfortyndingen med 9 ml fortyndingsvæske og fungere efter princippet for ekscentrisk rotation af indholdet i reagensglasset.

4.2. **Glasvarer**

4.2.1. Reagensglas med passende lukkeanordninger og tilstrækkelig kapacitet til at indeholde 10 ml af primærfortyndingen eller yderligere tifoldsfortyndinger, idet der samtidig skal være plads nok til blanding.

4.2.2. Flasker med en kapacitet på 150—200 ml eller glas med en kapacitet på ca. 20 ml til næringssubstratet.

4.2.3. Pipetter (med vatprop) af glas eller sterilt, syntetisk materiale med ubeskadiget spids og en nominal kapacitet på 1 ml samt en åbning med en diameter på 1,75—3 mm.

4.2.4. Petriskåle af klart, ufarvet glas eller sterilt, syntetisk materiale, hvor den nederste skål har en indvendig diameter på ca. 90—100 mm. Den indvendige dybde skal være mindst 10 mm. Bunden skal være fri for ujævnheder, som forstyrrer tællingen af kolonier.

4.2.5. **Sterilisation af glasvarer**

Glasvarer steriliseres ved en af følgende metoder:

a) henstand ved 170—175 °C i mindst en time i varmluftsovn (4.1.1)

b) henstand ved 121 ± 1 °C i mindst 20 minutter i autoklave (4.1.2).

Det skal sikres, at der sker tilstrækkelig gennemtrængning af damp i autoklaven; hvis udstyret f.eks. steriliseres i beholdere, skal disse ikke lukkes tæt, og kolber skal have løstsiddende låg.

Glasvarer, der er steriliseret i autoklaven, tørres ved dampventilation.

Pipetter steriliseres i varmluftsovn (4.1.1).

5. Dyrkningssubstrat — Milk plate count agar

5.1. *Sammensætning*

Gærekstrakt	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glukose D(+) eller dextrose	1,0 g
Skummetmælkpulver	1,0 g
Agar	10—15 g, afhængigt af den anvendte agars gelateringssevne
Vand	1 000 ml.

Skummetmælkpulveret skal være frit for hæmmende stoffer. Dette skal verificeres ved sammenlignende undersøgelser, hvor der anvendes skummetmælkpulver, som ikke indeholder hæmmende stoffer.

Fremstilling

Bestanddele opslættes og opløses i vandet i følgende rækkefølge: gærekstrakt, trypton, glukose og endelig skummetmælkpulver i vandet. Opvarmning af opslætningen fremmer denne proces. Agaren tilsættes, og der opvarmes til kogepunktet under stadig omrøring, eller i strømmende vanddamp i ca. 30 minutter indtil agaren er fuldstændig opløst.

Eventuelt filtreres gennem filterpapir.

pH-værdien kontrolleres med et pH-meter (4.1.4) og justeres eventuelt, således at den efter sterilisation er $6,9 \pm 0,1$ ved 25°C , idet der benyttes en opløsning (mindst $0,1 \text{ mol/l}$) af natriumhydroxid eller saltsyre.

5.2. *Fordeling, sterilisation og opbevaring af næringssubstrat*

Substratet (5.1) fordeles i portioner på 100—150 ml i flasker eller 12—15 ml i glas (4.2.2). Kolberne og glassene tilproppes.

Der steriliseres i autoklaven (4.1.2) ved $121 \pm 1^\circ\text{C}$ i 15 minutter.

Substratets pH kontrolleres.

Hvis substratet ikke skal bruges med det samme, opbevares det mørkt ved en temperatur på $1-5^\circ\text{C}$ i højst en måned efter fremstillingen.

5.3. *Dehydreret næringssubstrat — kommercielt tilgængeligt*

Næringssubstratet (5.1) kan fremstilles af dehydreret substrat. Brugsanvisningen følges, men skummetmælkpulveret tilsættes inden opløsning, hvis det ikke er en bestanddel.

pH-værdien justeres til $6,9 \pm 0,1$ ved 25°C som beskrevet i 5.1 og næringssubstratet fordeles, steriliseres og opbevares som beskrevet i 5.2.

6. Fortyndingsvæske

6.1. *Pepton-/saltopløsning*

Sammensætning

Pepton	1,0 g
Natriumklorid (NaCl)	8,5 g
Vand	1 000 ml

Fremstilling

Bestanddele opløses i vand, og hvis nødvendigt foretages opvarmning.

pH-værdien kontrolleres med et pH-meter (4.1.4) og justeres eventuelt, således at den efter sterilisation er $7,0 \pm 0,1$ ved $25 \pm 1^\circ\text{C}$, idet der benyttes en opløsning (mindst $0,1 \text{ mol/l}$) af natriumhydroxid eller saltsyre.

6.2. Ophældning, sterilisation og opbevaring af fortyndingsvæsker

Fortyndingsvæsken (6.1) fordeles i reagensglas (4.2.1) i en sådan mængde, at hvert glas efter sterilisation indeholder $9,0 \pm 0,2$ ml fortyndingsvæske. Glassene tilproppes.

Der steriliseres i autoklaven (4.1.2) ved 121 ± 1 °C i 15 minutter.

Fortyndingsvæskens pH-værdi kontrolleres.

Hvis fortyndingsvæsken ikke skal bruges med det samme, opbevares den mørkt ved en temperatur på 1—5 °C i højst en måned efter fremstillingen.

6.3. Dehydreret fortyndingsvæske — kommercielt tilgængelig

Fortyndingsvæsken (6.1) kan fremstilles af tabletter eller pulvere, som fås i dehydreret form. Brugsanvisningen følges. pH-værdien justeres som beskrevet i 6.1, og fortyndingsvæskerne fordeles, steriliseres og opbevares som beskrevet i 6.2.

7. Metodik**7.1. Smeltning af substratet**

Inden den mikrobiologiske undersøgelse smeltes den nødvendige mængde substrat hurtigt. Substratet tempereres til 45 ± 1 °C i vandbad (4.1.5).

7.2. Forbehandling af mælkeprøven

7.2.1. Pasteuriseret mælk inkuberes i uåbnet emballage eller, hvis dette ikke kan lade sig gøre, inkuberes en repræsentativ prøve på mindst 100 ml i 120 ± 2 timer ved $6 \pm 0,5$ °C i varmeskab (4.1.3.a)).

7.2.2. Efter inkubationen blandes mælkeprøven grundigt, således at mikroorganismene er fordelt så jævnt som muligt, ved at bunden på mælkeprøvebeholderen vendes hurtigt i vejret 25 gange. Undgå skumdannelse, eller lad skummet lægge sig. Intervallet mellem blanding og udtagning af analyseprøven må ikke være på over tre minutter.

7.3. Fremstilling af primærfortyndingen (10^{-1})

Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af prøven (7.2.2) til 9 ml fortyndingsvæske (6.1). Kontakt mellem pipetten og fortyndingsvæsken undgås. Fortyndingsvæskens temperatur skal være omtrent den samme som mælkeprøvens. Denne primærfortynding blandes omhyggeligt i mixeren (4.1.9) i 5—10 sekunder.

Der opnås således en primærfortynding på 10^{-1} .

7.4. Fremstilling af yderligere tifoldsfortyndinger

Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af primærfortyndingen (7.3) til 9 ml fortyndingsvæske (6.1) efter angivelse i punkt 7.3.

Der opnås således en fortynding på 10^{-2} .

Dette gentages for at opnå yderligere tifoldsfortyndinger, indtil det rette antal mikroorganismer kan forventes opnået (8.1).

7.5. Podning i petriskålene

Med en steril pipette (4.2.3) overføres 1 ml af prøven og/eller en passende tifoldsfortynding til en skål (4.2.4). Der skal undersøges mindst to fortyndinger. Der laves en skål med hver valgt fortynding (8.1).

7.6. Ophældning

Ca. 15—18 ml af substratet (7.1) ophældes i hver podet skål.

Straks efter ophældningen blandes ved drejning af petriskålen tilstrækkeligt til at opnå jævnt dispergerede kolonier efter inkubation.

Der må højst gå 15 minutter mellem afslutningen af fremstillingen af mælkeprøven og blandingen af fortyndingen med substratet.

Man lader det størkne på en ren, kølig, vandret flade.

7.7. *Inkubation af petriskåle*

Skålene stilles i varmeskabet (4.1.3.b)). Skålene inkuberes med lågene nedad. Der må ikke stilles mere end seks skåle oven på hinanden. Stakkene af skåle må ikke røre hinanden eller varmeskabets sider.

Der inkuberes ved 21 ± 1 °C i 25 timer.

7.8. *Tælling af kolonier*

Kolonierne i de petriskåle, der indeholder højst 300 kolonier, tælles.

Skålene undersøges i dæmpet belysning. Der kan for at lette tællingen benyttes en egnet lup (4.1.6) og/eller et tælleinstrument (4.1.8). Bundfaldspartikler i skålene må ikke forveksles med enkeltkolonier. Tvivlsobjekter undersøges omhyggeligt med en stærkere lup (4.1.7), når det er nødvendigt for at skelne kolonier fra fremmede stoffer.

Spredningskolonier betragtes som enkeltkolonier. Hvis mindre end en fjerdedel af skålen er overgroet med spredningskolonier, tælles kolonierne på den del af skålen, som ikke er berørt, og det tilsvarende tal beregnes for hele skålen. Hvis mere end en fjerdedel af skålen er overgroet med spredningskolonier, kasseres skålen.

8. **Beregning og angivelse af resultater**

8.1. Der bruges tal fra alle skåle, som indeholder 10—300 kolonier (se 8.3 og 8.4).

8.2. Antallet af mikroorganismer pr. 1 ml pasteuriseret mælk angives ved formlen:

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

hvor

ΣC er summen af kolonier optalt som i 8.1.1

$(n_1 + 0,1 n_2) d$ svarer til volumen af den talte prøve, hvor:

n_1 er antallet af skåle, der er talt i første fortynding

n_2 er antallet af skåle, der er talt i anden fortynding,

d er fortyndingsfaktoren, som lå til grund for de første tællinger.

Tallet afrundes til to signifikante cifre. Når cifret, der skal afrundes, er 5, afrundes det, således at tallet umiddelbart til venstre er lige.

Eksempel

Fortynding 10^{-2} : 278 og 290 kolonier

Fortynding 10^{-3} : 33 og 28 kolonier

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

8.3. Hvis der kun er tal på under 10, registreres antallet af mikroorganismer pr. ml som »mindre end $10 \times d$ pr. ml«, hvor »d« er det reciprokke tal til den laveste fortyndingsfaktor.

8.4. Hvis der kun er tal på over 300, men tælling er mulig, beregnes et skønnet tal på grundlag af skåle med de tal, der kommer nærmest på 300 kolonier, og dette ganges med det reciprokke tal til fortyndingsfaktoren. Resultatet registreres som »skønnet antal mikroorganismer pr. ml«.

9. **Nøjagtighed**

Der foreligger ingen resultater af internationalt godkendte sammenlignende undersøgelser.

VI. TÆLLING AF COLIFORME BAKTERIER VED 30 °C

1. Omfang og anvendelsesområde

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til tælling af coliforme bakterier i pasteuriseret mælk ved en kolonitællingsteknik ved 30 °C.

2. Definition

Ved »coliforme bakterier« forstås bakterier, som ved 30 °C danner karakteristiske kolonier eller ukarakteristiske kolonier, der kan forgære laktose under luftudvikling under de beskrevne betingelser.

3. Princip

En defineret mængde af mælkeprøven blandes med næringssubstratet i petriskåle og inkuberes ved 30 °C i 24 timer. Karakteristiske kolonier optæles, og eventuelt ukarakteristiske koloniers identitet bekræftes ved kontrol af evnen til at forgære laktose. Antallet af coliforme bakterier pr. 1 ml pasteuriseret mælk beregnes derefter.

4. Apparatur og glasvarer

Sædvanligt laboratorieudstyr og i særdeleshed:

4.1. Apparatur

4.1.1. Varmluftsovn, som kan fungere ved 170—175 °C.

4.1.2. Autoklave, der kan fungere ved 121 ± 1 °C.

4.1.3. Varmeskab, der overalt kan holde en temperatur på 30 ± 1 °C.

4.1.4. pH-meter med en nøjagtighed på $\pm 0,1$ pH-enhed, med temperaturkompensation.

4.1.5. Vandbad, der kan holde en temperatur på 45 ± 1 °C.

4.1.6. Podenål af platiniridium eller nikkelkrom.

4.2. Glasvarer

4.2.1. Reagensglas med passende lukkeanordninger og en kapacitet på 20 ml til verifikationssubstrat (5.2) og durhamrør i passende dimensioner til brug sammen med reagensglassene

4.2.2. Flasker med en kapacitet på 150—200 ml til det faste, selektive substrat (5.1)

4.2.3. Pipetter (med vatprop) af glas eller sterilt, syntetisk materiale med ubeskadiget spids og en nominel kapacitet på 1—10 ml samt en åbning på 1,75—3 mm

4.2.4. Petriskåle af klart, ufarvet glas eller sterilt, syntetisk materiale, hvor den nederste skål har en indvendig diameter på ca. 90—100 mm. Den indvendige dybde skal være mindst 10 mm. Bunden skal være fri for ujævnheder, som kan forstyrre tællingen af kolonier.

4.2.5. Sterilisation af glasvarer

Glasvarer steriliseres ved en af følgende metoder:

a) henstand ved 170—175 °C i mindst en time i varmluftsovn (4.1.1)

b) henstand ved 121 ± 1 °C i mindst 20 minutter i autoklave (4.1.2).

Det skal sikres, at der sker tilstrækkelig gennemtrængning af damp i autoklaven; hvis udstyret f.eks. steriliseres i beholdere, skal disse ikke lukkes tæt, og kolber skal have løstsiddende låg.

Glasvarer, der er steriliseret i autoklaven, tørres ved dampventilation.

Pipetter steriliseres i varmluftsovn (4.1.1).

5. Næringssubstrater**5.1. Rød-violet galdelaktose agar (RVG agar). Fast, selektivt substrat.****Sammensætning**

Pepton	7 g
Gærekstrakt	3 g
Laktose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Natriumklorid (NaCl)	5 g
Galdesalte	1,5 g
Neutralrødt	0,03 g
Krystalviolet	10—15 g (afhængigt af den anvendte gelatineringsevne)
Vand	1 000 ml.

Fremstilling

Bestanddele opslættes og opløses i vandet, og man lader det henstå i flere minutter. Derefter blandes kraftigt.

pH-værdien kontrolleres med en pH-måler (4.1.4) og justeres eventuelt, således at den efter kogning er $7,4 \pm 0,1$ ved 25 °C, idet der benyttes en opløsning (mindst 0,1 mol/l) af natriumhydroxid eller saltsyre.

Substratet opvarmes til kogepunktet, skvulpes af og til og fordeles straks i portioner på 100—150 ml i sterile flasker (4.2.2). Substratet tempereres i vandbad (4.1.5) ved 45 ± 1 °C.

Substratets sterilitet skal kontrolleres på anvendelsestidspunktet (se 6.4).

Substratet skal bruges inden tre timer efter fremstillingen.

5.2. Brillantgrønt laktosegalde bouillon. Verifikationssubstrat.**Sammensætning**

Pepton	10 g
Laktose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Dehydreret oksegalde	20 g
Brillantgrønt	0,0133 g
Vand	1 000 ml.

Fremstilling

Bestanddelene opløses i vandet ved kogning.

pH-værdien kontrolleres med et pH-meter (4.1.4) og justeres eventuelt, således at den efter sterilisation er $7,2 \pm 0,1$ ved 25 °C, idet der benyttes en opløsning (mindst 0,1 mol/l) af natriumhydroxid eller saltsyre.

Substratet doseres i portioner på 10 ml i reagensglas, hvori der er anbragt durhamrør med bunden opad (4.2.1). Glassene tilproppes.

Reagensglassene steriliseres i autoklaven (4.1.2) ved 121 ± 1 °C i 15 minutter.

Durhamrørene må ikke indeholde luftbobler efter sterilisationen.

Substratets pH kontrolleres.

Hvis substratet ikke skal bruges straks, skal det opbevares mørkt ved en temperatur på 1—5 °C i højst en måned efter fremstillingen.

5.3. Dehydreret næringssubstrat — kommercielt tilgængeligt

Næringssubstratet (5.1, 5.2) kan fremstilles af substrater, som fås i dehydreret form. Brugsanvisningen følges. pH-værdien justeres og doseres, koges eller steriliseres og opbevares som beskrevet i 5.1 og 5.2.

6. Metodik**6.1. Substrat**

Substratet (RVG agar) som beskrevet i 5.1 benyttes.

6.2. Forbehandling af mælkeprøven

Mælkeprøven blandes grundigt, således at mikroorganismene fordeles så jævnt som muligt ved at bunden på mælkeprøvebeholderen hurtigt vendes i vejret 25 gange. Undgå skumdannelse eller lad skummet lægge sig. Intervallet mellem blanding og udtagning af analyseprøven må ikke overskride tre minutter.

6.3. Podning i petriskålene

3 ml af mælkeprøven (6.2) udsås ved overførsel med en steril pipette (4.2.3) af 1 ml af mælkeprøven til hver af de tre skåle (4.2.4).

6.4. Ophældning

RVG agar (6.1) ophældes i hver podet skål i portioner på ca. 12 ml.

Straks efter ophældningen blandes der ved drejning af petriskålen tilstrækkeligt til, at kolonierne fordeles jævnt efter inkubation.

Der må højst gå 15 minutter mellem afslutningen af forbehandlingen af mælkeprøven og blandingen af analyseprøven med substratet.

Til kontrol af steriliteten overføres 12 ml af den RVG agar, der blev brugt til de podede skåle, til en upodet skål.

Substratet skal størkne på en ren, kølig, vandret flade, indtil det er stivnet.

Efter fuldstændig størkning hældes der mindst 4 ml RGV agar (6.1) ud på det podede substrats overflade.

Man lader det størkne.

6.5. Inkubation af petriskåle

Skålene stille i varmeskabet (4.1.3). Skålene inkuberes med lågene nedad. Der må ikke sættes mere end seks oven på hinanden. Stakke af skåle må ikke røre hinanden eller varmeskabets sider.

Der inkuberes ved 30 ± 1 °C i 24 ± 2 timer.

6.6. Tælling af kolonier

6.6.1. Kolonierne i de petriskåle, der indeholder højst 150 kolonier, tælles. De mørkerøde kolonier med en diameter på mindst 0,5 mm med eller uden omgivende præcipitation, som er karakteristisk for coliforme bakterier, tælles.

6.6.2. Hvis alle kolonierne eller nogle af dem har et ukarakteristisk udseende (f.eks. adskiller sig fra typiske kolonier i farve, størrelse eller dannelse af præcipitat), udføres en verifikationsprøve (6.7).

6.7. Verifikationsprøve

Efter anvisningerne i 6.6.2 foretages en verifikationsprøve på et passende antal (f.eks. 3 til 5) ukarakteristiske kolonier ved podning i glas med brillantgrønt laktosegalde bouillon (5.2) med en podenål (4.1.6). Glassene inkuberes ved 30 ± 1 °C i 24 ± 2 timer.

Kolonier, som producerer luft i durhamrørene, betragtes som verificerede bakteriekolonier.

7. Beregning og angivelse af resultater

7.1. Til tællingen benyttes (se 7.4) skåle, som indeholder højst 150 kolonier.

7.2. Hvis der benyttes en verifikationsprøve, beregnes antallet af kolonier af coliforme bakterier på grundlag af procentdelen af verificerede coliforme bakterier.

7.3. Antallet af coliforme bakterier pr. 1 ml pasteuriseret mælk angives ved formlen:

$$\frac{\sum C}{n}$$

hvor

ΣC = er det samlede antal kolonier af coliforme bakterier (7.1 i forbindelse med 7.2), som er fundet ved undersøgelse af mælkeprøven (3 ml).

n = er antallet af ml i den undersøgte prøve (6.3.1) (3 ml).

Tallet afrundes til to signifikante cifre, hvis der er over 100 kolonier. Når cifret, der skal afrundes, er 5, afrundes det, således at tallet umiddelbart til venstre er lige.

Hvis der kun er tal på over 150 kolonier, registreres resultatet som »Skønnet antal coliforme bakterier pr. 1 ml«.

8. Nøjagtighed

Der foreligger ingen resultater af internationale sammenlignende prøver.

VII. TÆLLING AF SOMATISKE CELLER

Dette er en beskrivelse af to metoder som referencemetoder til tælling af somatiske celler:

- A. Mikroskopmetoden
- B. Den fluoro-opto-elektroniske metode

A. Mikroskopmetode**1. Omfang og anvendelsesområde**

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til tælling af somatiske celler i rå mælk.

Dette er en beskrivelse af metoden til tælling af antallet af celler i mælkeprøver med henblik på kalibrering og kontrol af nøjagtigheden af den fluoro-opto-elektroniske metode (se B.1).

2. Definition

Ved somatiske celler forstås her de celler, f.eks. leukocytter og epitelceller, hvis kerner kan farves tydeligt med metylenblåt.

3. Princip

0,01 ml mælk spredes over 1 cm² af et objektglas. Filmen tørres og farves. Tælling foretages under mikroskop. Antallet af somatiske celler, som er talt i et defineret område, ganges med arbejdsfaktoren for at opnå antallet af celler/ml.

4. Reagenser

Der skal anvendes kemikalier af analysekvalitet.

*Farveopløsning***Sammensætning**

Metylenblåt	0,6 g
Ethanol — 99 %	54,0 ml
1,1,1-trikloretan eller tetrakloretan	40,0 ml
Iseddikesyre	6,0 ml

Advarsel

Tetrakloretan er giftigt. Hvis det benyttes, skal fremstillingen og påføringen ske i et stinkskab.

Fremstilling

Ethanol og 1,1,1-trikloretan eller tetrakloretan blandes i en flaske og opvarmes i vandbad til 60 til 70 °C. Metylenblåt tilsættes. Der blandes omhyggeligt, afkøles i køleskab til 4 °C i 12 til 24 timer og tilsættes iseddikesyre. Der filtreres gennem et filter med en porestørrelse på 10 til 12 mikrometer eller derunder, og farveopløsningsvæsken opbevares i en lufttæt flaske. Hvis der dannes partikler eller sediment, filtreres den igen inden brug.

5. Apparatur og glasvarer

- 5.1. *Mikroskop* med en forstørrelse på 500 til 1 000 gange.
- 5.2. *Mikrosprøjte*, 0,01 ml med en nøjagtighed på $\pm 2\%$ eller bedre.

- 5.3. *Objektglas* med et areal på 20 mm × 5 mm afmærket til filmen eller et standardobjektglas og en skabelon på 20 mm × 5 mm til filmen.
- 5.4. *Plan varmeplade* (30 til 50 °C) til tørring af objektglassene.
- 5.5. *Blæser* (hårtørrer) til tørring af filmen.
- 5.6. *Vandbad*, som kan fungere ved 30 til 40 °C til opvarmning af mælkeprøven.
- 5.7. *Mikrometerobjektglas* opdelt i 0,01 mm.

6. **Metodik**

6.1. *Mælkeprøver*

Mælkeprøven skal undersøges inden seks timer efter prøveudtagningen. Under opbevaringen må prøvens temperatur ikke overstige 6 °C. Frysning skal undgås.

6.2. *Fremstilling af prøven i laboratoriet*

Prøven opvarmes i vandbad (5.6) til 30 til 40 °C; den blandes omhyggeligt. Der afkøles til den temperatur, hvortil mikrosprøjten (5.2) er kalibreret, f.eks. 20 °C.

6.3. *Forbehandling af objektglassene*

Objektglassene (5.3) rengøres, f.eks. med ethanol, tørres med støvfrit papir, flamberes og afkøles. Opbevares i kasse, så støv undgås.

6.4. *Fremstilling af film*

0,01 ml mælk fra prøven, der er behandlet som ovenfor, udtages med en mikrosprøjte (5.2). Ydersiden af sprøjten, der er i kontakt med mælken, rengøres omhyggeligt. Sprøjten anbringes på objektglasset (5.3), efter at konturen af feltet (20 mm × 5 mm) er tegnet. Derefter udfyldes feltet så jævnt som muligt. Filmen tørres på en plan varmeplade (5.4), indtil den er helt tør.

Mindst to film skal behandles og undersøges for hver mælkeprøve.

6.5. *Farvning af film*

Filmen dyppes i farveopløsning (4) i 10 minutter. Filment tørres og eventuelt afsluttes med blæseren (5.5). Filmen dyppes i postevand, indtil al overskudsfarve er skyllet væk. Derefter tørres igen, og filmen opbevares, så den ikke udsættes for støv.

6.6. *Kalibrering af mikroskopets synsfelt*

Mikroskopfeltets diameter bestemmes med mikrometerobjektglasset som funktion af den valgte forstørrelse (500 til 1 000 gange).

7. **Tælling og beregning**

7.1. *Tælling af celler*

Der benyttes et mikroskop (5.1). I stedet for at tælle celler tælles kun cellekerner. Disse er tydeligt genkendelige, og med henblik på tællingen skal mindst halvdelen af kernen være synlig i mikroskopifeltet. Der tælles striber eller felter hen over den midterste tredjedel af filmen. Det undgås at tælle striber eller felter, som udelukkende er valgt fra perifere områder af filmene. Den omhyggelige behandling af filmene og resultaternes deraf følgende pålidelighed skal kontrolleres mindst en gang om måneden ved tælling af forskellige dele af filmen. Tællingen kan også foretages ved tælling af mikroskopifelter, der er spredt på en sådan måde, at alle dele af filmen er ligeligt repræsenteret.

7.2. *Det minimale antal celler, der skal tælles*

Da mikroskopisk tælling af somatiske celler også kan benyttes til standardisering af automatiske og mekaniserede tællingsmetoder, må variationskoefficienten for tællinger af identiske prøver ikke være større end for elektroniske instrumenter. Variationskoefficienten for en mælkeprøve, der indeholder 400 000 til 600 000 celler/ml, må ikke overstige 5%.

Antallet af somatiske celler, der skal tælles i hver prøve, skal ifølge Poisson-fordelingens karakteristika være mindst 400, for at denne repeterbarhed opnås.

Poisson-fordelingen forudsætter, at

$$M = V = s^2$$

hvor

M er middelværdien

V er varianten

og

s er standardafvigelsen.

Variationskoefficienten (VK) er

$$VK = \frac{s \times 100\%}{M} \text{ eller } VK = \frac{100\%}{s} \text{ eller } VK = \frac{100\%}{\sqrt{M}}$$

M (middel) angiver antallet af partikler (celler), som er optalt (dvs. 400 for VK = 5%).

7.3. *Beregning af arbejdsfaktoren*

Arbejdsfaktoren beregnes ifølge 7.3.1 eller 7.3.2 ved brug af 0,01 ml mælk.

7.3.1 *Tælling af bælteer på tværs af filmen*

Bælterne, der skal tælles, er hver især 5 mm lange. Bælternes bredde svarer til mikroskopifeltets diameter som bestemt af mikrometerobjektglasset (5.7).

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

hvor

d = er mikroskopifeltets diameter i millimeter

b = er antallet af bælteer, der er fuldstændig optalt.

7.3.2. *Tælling af mikroskopifelter i den midterste tredjedel af filmen eller med et gitter*

$$\text{Arbejdsfaktor} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12\,732}{d^2 \times s}$$

hvor

d = er mikroskopifeltets diameter i mm som bestemt af mikrometerobjektglasset (5.7)

s = er antallet af optalte felter.

7.4. *Beregning af celletal*

Antallet af optalte somatiske celler (7.1 og 7.2) ganges med arbejdsfaktoren (7.3) for at give antallet af celler pr. ml mælk.

7.5. *Nøjagtighed*

Variationskoefficienten (se 7.2) må ikke overstige 5%.

Der foreligger ikke nogen resultater af internationale sammenlignende prøver.

B. *Fluoro-opto-elektronisk metode*

1. *Omfang og anvendelsesområde*

Dette er en beskrivelse af referencemetoden, som efter korrekt kalibrering (se A.1) kan benyttes til tælling af somatiske celler i rå mælk — med eller uden kemisk konservering.

2. Definition

Ved somatiske celler forstås her partikler med en minimumsfluorescensstyrke som følge af farvningen af de somatiske cellekerners DNA.

3. Princip

En del af prøven (f.eks. 0,2 ml) blandes grundigt med bufferopløsning og fluorescensopløsning. En del af denne blanding overføres derefter i form af en tynd film til en roterende disk, der fungerer som objektplan for mikroskopet.

Hver celle producerer en elektrisk impuls, som forstærkes og registreres. Antallet af somatiske celler udskrives i tusinde pr. ml.

4. Reagenser

Der skal benyttes kemikalier af analysekvalitet, medmindre andet er angivet. Vandet skal enten være destilleret eller ionbyttet eller af tilsvarende renhed.

4.1. Bufferopløsning**Sammensætning**

Kaliumhydrogenftalat 51,0 g

Kaliumhydroxid 13,75 g

Polyethylenglykol-mono-p-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-fenyl-æter
(f.eks. Triton X-100), 1% (V/W) 10 ml

pH 5,7 — 5,9. Destilleret vand tilsættes til 10 000 ml.

Fremstilling

De enkelte bestanddele blandes. Opbevares lufttæt i højst syv dage.

4.2. Fluorescensopløsning (stamopløsning)**Sammensætning**

Etidiumbromid 1,0 g

Vand til 1 000 ml.

Fremstilling

Etidiumbromid opløses i vand. Opbevares i lys- og lufttæt flaske i højst to måneder.

4.3. Fluorescensopløsning (arbejdsopløsning)

20 ml af stamopløsningen (4.2) blandes med bufferopløsningen (4.1) til 1 000 ml. Arbejdsopløsningen må ikke benyttes i mere end syv døgn.

4.4. Rengøringsopløsning**Sammensætning**

Bufferopløsning (4.1) 10 ml

Polyethylenglykol-mono-p-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-fenyl-æter
(f.eks. Triton X-100), 1 volumenprocent 10 ml

Ammoniak, 25 volumenprocent 25 ml

Destilleret vand tilsættes til 10 000 ml.

Fremstilling

De enkelte bestanddele blandes. Opbevares i højst 30 dage.

5. Apparatur og glasvarer**5.1. Tællingsinstrument, der arbejder efter det fluorescensoptiske princip.****NB:**

Instrumentet skal kalibreres inden brug. Forholdet mellem volumen af de partikler, der skal tælles, og grænseværdien, over hvilken tællingerne foretages, bestemmes. Kalibrering af apparatet sker ifølge brugsanvisningen ved brug af prøver, hvis celleindhold er bestemt ved mikroskopimetoden.

5.2. Vandbad med circulation, der kan fungere ved 40 ± 1 °C.

5.3. Reagensglas med passende lukkeanordning, ca. 15 ml.

6. Mælkeprøver

6.1. Prøven skal opbevares ved lav temperatur i et prøveglas (5.3). Hvis prøven ikke er konserveret kemisk, bør den ikke tælles inden for de første 24 timer efter udmalkning, da tallene så vil være for lave. Opbevaringstemperaturen må ikke overstige 6 °C.

6.2. Konservering

Kemisk konservering skal foretages inden 24 timer. Konservering skal ske snarest muligt efter prøveudtagningen.

6.2.1. Kemisk konservering af prøven kan ske ved tilsætning af et af følgende konserveringsmidler:

— ortoborsyre

Den endelige koncentration af ortoborsyre i prøven må ikke overstige 0,6 g/100 ml. Sådanne konserverede prøver kan opbevares i yderligere 24 timer ved 6 til 12 °C

— kaliumdikromat

Den endelige koncentration af kaliumdikromat må ikke overstige 0,2 g/100 ml. Sådanne konserverede prøver kan opbevares i yderligere 72 timer ved 6 til 12 °C

— natriumazid

Prøven kan konserveres med natriumazid til en endelig koncentration på 0,024 g/100 ml, forudsat at prøverne afkøles til 6 til 12 °C straks efter prøveudtagning og tælles inden for 48 timer efter prøveudtagningen

— bronopol

Prøverne kan konserveres med bronopol til en endelig koncentration på 0,05 g/100 ml, forudsat at prøverne afkøles til 6 til 12 °C umiddelbart efter prøveudtagning og tælles inden for 72 timer efter prøveudtagningen.

6.2.2. Prøver, der allerede er konserveret med ortoborsyre, kan konserveres i yderligere 48 timer med kaliumdikromat.

NB:

Der skal tages hensyn til lokale bestemmelser vedrørende udledning af spildevand i forbindelse med prøver, der konserveres med kaliumdikromat.

7. Metodik

7.1. Forbehandling af prøverne

Mælkeprøver, der skal undersøges, skal opbevares i mindst 24 timer ved ca. 2 til 6 °C efter udlagringen. Det anbefales ikke at foretage celletælling uden forbehandling på malkedagen, da resultaterne kan være for lave. Hvis det er nødvendigt at foretage tælling af sådanne prøver, skal de forbehandles i mindst tre timer med kaliumdikromat (se 6.2.1).

7.2. Forbehandling

Den forbehandlede prøve (se 7.1) eller den ubehandlede prøve, som er mindst et døgn gammel, opvarmes i vandbad (5.2) til ca. 40 °C. Prøven opbevares derefter ved stuetemperatur, indtil tællingen foretages.

7.3. Tælling af celler

Tælling skal udføres ved hjælp af tællingsinstrument (5.1) inden 15 minutter efter afslutningen af opvarmningen (se 7.2). Umiddelbart inden tælling skal prøverne blandes grundigt, så der opnås en så ensartet fordeling af de somatiske celler som muligt.

Yderligere fortynding og behandling af prøverne sker automatisk i instrumentet.

8. Nøjagtighed

Der foreligger ingen tal for repeterbarhed (r) og reproducerbarhed (R) fra internationale sammenlignende prøver. I fremtiden vil der blive givet nøjagtighedsdata.

Der kan på grundlag af de data, der foreligger på nationalt plan, foretages følgende skøn:

Celletællingsniveau mellem 400 000 og 500 000/ml

— standardafvigelse for repeterbarhed:

$$s_r = 20\,000 \text{ celler/ml}$$

(svarende til en variationskoefficient på 5% — 4%)

— standardafvigelse for reproducerbarhed:

$$s_R = 40\,000 \text{ celler/ml}$$

(svarende til en variationskoefficient på 10% — 8%).

9. Nøjagtighedskontrol

Nøjagtighedskontrol udføres ved brug af prøver med et kendt celletal (P) bestemt ved mikroskopitællinger af celler på et nationalt referencelaboratorium.

VIII. PÅVISNING AF ANTIBIOTIKA OG SULFONAMIDER

OMFANG OG ANVENDELSESOMRÅDE

Dette er en beskrivelse af referencemetoden til påvisning af antibiotika og sulfonamider i rå mælk og varmebehandlet mælk.

Referencemetoden omfatter:

A. Kvalitativ metode

Denne metode er den indledende undersøgelse, hvormed mælkeprøver, der indeholder antibiotika, herunder sulfonamider, udvælges. Den beskrevne metode er en af en række lignende metoder, som i princippet alle benytter *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 som testorganisme. Metoden er valgt som værende repræsentativ for disse prøver.

B. Metode til bekræftelse og identifikation af penicillin

Denne metode skal benyttes til bekræftelse af den kvalitative metode, identificering af penicillin og bestemmelse af penicillinkoncentrationen.

A. Kvalitativ metode

1. Omfang og anvendelsesområde

Dette er en beskrivelse af den kvalitative påvisning af antibiotika og sulfonamider i rå og varmebehandlet mælk, når indholdet overskrider de grænser, som er angivet i tabellen:

Påviselige koncentrationer af forskellige antibiotika og sulfonamider ⁽¹⁾

	Prøvefølsomhed	
	helt negativ	helt positiv
Benzylpenicillin	0,002	0,006
Ampicillin	0,002	0,005
Cloxacillin	0,015	0,035
Nafcillin	0,006	0,011
Tetracyclin	0,10	0,40
Oxytetracyclin	0,20	0,45
Klortetracyclin	0,15	0,50
Kloramfenikol	7	15
Duhydrostreptomycin	4	13
Neomycin	1	22
Kanamycin	9	28
Bicitracin	0,06	0,14
Erytromycin	1	2,25
Rifamycin	0,01	0,14
Diafenylsulfon	0,01	0,1
Sulfametazin (Sulfatimidin)	0,5	1

⁽¹⁾ Benzylpenicillin og bacitracin er udtrykt som IE/ml, alle andre antibiotika som µg/ml.

2. Definition

Mælken indeholder antibiotika eller sulfonamider, når substratets farve ikke ændres (se 7.1).

3. Princip

Til en agargel, der indeholder pH-indikator og sporer af *Bacillus stearothermophilus* var. *colidolactis* ATCC 10149 (se 5.4.1), som har en god alsidig følsomhed, og som er særligt følsom over for hæmning med penicillin, tilsættes en mælkeprøve sammen med næringsstoffer. Ved inkubation, der resulterer i organismens normale vækst og syreproduktion, ændres pH-indikatorfarven fra violet til gul. Tilstedeværelsen af stoffer i mælken, som virker hæmmende på organismens vækst, får pH-indikatorfarven til at forblive violet.

4. Apparatur og glasvarer

Sædvanligt laboratorieudstyr og i særdeleshed:

4.1. Apparatur

4.1.1. Varmeskab, der kan holde en temperatur på $64\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2. Vandbad, der kan holde en temperatur på $64\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.3. Stativ til glas eller ampuller.

4.1.4. Pipette med engangspidser til prøveudtagning og dosering af 0,1 ml.

4.1.5. Tang eller pincet

4.1.6. Varmluftsovn, der kan holde en temperatur på 170 til $175\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.7. Autoklave, der kan holde en temperatur på $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.8. pH-meter

4.2. Glasvarer

4.2.1. Prøveflasker med passende lukkeanordninger.

NB:

Visse gummiproppe kan afsætte hæmmende stoffer på flaskehalsen.

4.2.2. Petriskåle af klart, ufarvet glas eller sterilt, syntetisk materiale med flad bund af ensartet tykkelse, mindste indvendige diameter ca. 140 mm.

4.2.3. Flasker med en kapacitet på 250 ml.

4.2.4. Pipetter (med vatprop) af glas eller sterilt, syntetisk materiale med en nominal kapacitet på 1 ml og 10 ml.

4.2.5. Glasspatler

4.2.6. Glas eller ampuller, indvendig diameter ca. 8 mm, med kapsel eller prop.

4.2.7. Sterilisation af glasvarer

Glasvarer steriliseres ved en af følgende metoder:

a) henstand ved 170 til $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ i mindst en time i varmluftsovn (4.1.6)

b) henstand ved $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ i mindst 20 minutter i autoklave (4.1.7).

Det skal sikres, at der sker tilstrækkelig gennemtrængning af damp i autoklaven; hvis udstyret f.eks. steriliseres i beholdere, skal disse ikke lukkes tæt, og kolber og flasker skal have løstsiddende låg.

Glasvarer, der er steriliseret i autoklaven, tørres ved dampventilation.

Pipetter steriliseres i en varmluftsovn.

5. Substrater, opløsninger, testorganisme

Substraternes bestanddele skal være egnede til bakteriologiske formål. Det anvendte vand skal være glasdestilleret eller demineraliseret med mindst tilsvarende renhed. Det må ikke indeholde stoffer, som virker hæmmende på testorganismen.

5.1. *Substrater*5.1.1. *Næringsagar*

Sammensætning

Gærekstrakt	2 g
Pepton	5 g
Kødekstrakt	1 g
Natriumklorid	5 g
Agar	10 til 15 g
Vand	1 000 ml

Fremstilling

Bestanddelene opløses i vand. Der opvarmes til kogning med lejlighedsvis skvulpning. pH indstilles, så der opnås en værdi på $7,4 \pm 0,1$ ved 25°C efter sterilisation.

Til fremstilling af skråsubstrat tilsættes henholdvis 10 ml i prøveglas eller 100 ml i flasker.

Substratet steriliseres ved $121 \pm 1^\circ\text{C}$ i 15 minutter.

5.1.2. *Agarsubstrat*

Sammensætning

Natriumklorid	2 g
Agar	15 g
Vand	1 000 ml
Trimethoprimopløsning eller tetroxoprimopløsning (se 5.1.3) ⁽¹⁾	10 ml

Fremstilling

Alle bestanddele bortset fra trimethoprim- eller tetroxoprimopløsningen opløses i vand. Der opvarmes til kogning med lejlighedsvis skvulpning. Trimethoprim- eller tetroxoprimopløsningen tilsættes, og der steriliseres ved $121 \pm 1^\circ\text{C}$ i 15 minutter; pH indstilles, så der opnås en værdi på $7,0 \pm 0,1$ ved 25°C efter sterilisation.

5.1.3. *Trimethoprim- eller tetroxoprimopløsning*

Sammensætning

Trimethoprim	5 mg
eller tetroxoprim	30 mg
Ethanol, 96 %	5 ml/30 ml
Vand	ad 1 000 ml

Fremstilling

Trimethoprim eller tetroxoprim opløses i ethanol (5 eller 30 ml) og fortyndes med vand.

5.1.4. *Næringsstof*

Sammensætning

Gærekstrakt	0,75 mg
Glukose	5,0 mg
Opløselig stivelse	8,0 mg
Bromkresolpurpur	0,025 g
Vand	ad 50 ml

Fremstilling

Bestanddelene opløses i vand, evt. under opvarmning, og der sterilfiltreres. Næringsstoffet fås i handelen som tabletter.

5.2. *Standardpenicillinopløsninger*

5.2.1. Der fremstilles en *penicillinopløsning på 60 µg/ml (= 100 IE/ml)* ved opløsning af krystallinsk natrium- eller kaliumbenzylpenicillin i sterilt destilleret vand i en steril flaske med hensigtsmæssigt lukke.

5.2.2. Der fremstilles en *arbejdsopløsning af penicillin* ved tilsætning af 1,25 ml af penicillinopløsningen (5.2.1) til sterilt, destilleret vand til 1.000 ml. Denne arbejdsopløsning indeholder 0,075 µg/ml (= 0,125 IE/ml).

5.2.3. Der fremstilles 75 ml *standardpenicillinopløsning* indeholdende 0,004 µg/ml (= 0,0067 IE/ml) penicillin ved tilsætning af 71 ml inhibitorfri mælk (5.3) til 4 ml af arbejdspenicillinopløsningen (5.2.2), der blandes.

⁽¹⁾ Patentlovgivningen omhandlende brug af dyrkningsmedia med indhold af ante-fetal bestanddele skal tages i betragtning.

- 5.2.4. De i 5.2.1 til 5.2.3 nævnte penicillinopløsninger skal fremstilles den dag, prøven udføres.
- 5.3. *Inhibitorfri mælk*
- Til kontrol fremstilles *inhibitorfri mælk* ved genfortynding (10 % m/v) af skummetmælkspulver, som tidligere er prøvet og fundet frit for hæmmende stoffer, i sterilt, destilleret vand. Alternativt kan en tilstrækkelig stor mængde frisk mælk, som er prøvet og fundet fri for hæmmende stoffer, doseres i flasker, opvarmes en time ved 100 °C og derefter opbevares i køleskab ved 0 til 6 °C i højst en uge.
- 5.4. *Testorganisme*
- 5.4.1. Som testorganisme benyttes *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* stamme ATCC 10149. Stammen er identisk med C 953.
- 5.4.2. Der fremstilles en *stamkultur* til vedligeholdelse af testkulturen. Testkulturen opbevares på et skråsubstrat af næringsagar (5.1.1). Skråagarsubstratet stregpodes på overfladen ved brug af en podeskål med testkulturen og inkuberes earobt i 48 timer ved 63 ± 1 °C. Efter inkubationen forsegles glasset med en steril gummiprop. Denne stamkultur kan opbevares i flere måneder i køleskab ved 0 til 5 °C.
- 5.5. *Testkultur (sporeoplæsning)*
- 5.5.1. 20 ml af den smeltede næringsagar (5.1.1) overføres aseptisk til en steril petriskål (4.2.2) og afkøles til stuetemperatur.
- 5.5.2. Med en steril pipette (4.2.4) overføres 5 ml sterilt, destilleret vand til et glas med stamkultur (5.4.2), og sporerne skylles af skråagarsubstratet med en steril podenål. Denne sporeoplæsning skal opbevares ved 0 til 5 °C og benyttes inden for 36 timer.
- 5.5.3. Med en steril pipette (4.2.4) overføres 0,5 ml af sporeoplæsningen (5.5.2) til en agarplade (5.5.1), og podestoffet spredes grundigt over hele overfladen med en bøjet glasstang. Der inkuberes ved 63 ± 1 °C (4.1.1) i 16 til 18 timer.
- Når der benyttes en stamkultur (5.4.2) eller en kultur, som er over 36 timer gammel, skal podning foretages mindst to gange med et interval på højst 36 timer.
- 5.5.4. Med en steril pipette (4.2.4) overføres 10 ml destilleret vand til agarpladen (5.5.3), og med en glasstav bringes sporer, der flyder på overfladen, ned i væsken.
- Sporeoplæsningen overføres til en flaske (4.2.3), der indeholder 250 ml sterilt, destilleret vand. Flasken lukkes og rystes grundigt. Kulturer, som ikke skal podes umiddelbart, opbevares i køleskab ved 0 til 6 °C.
- 5.5.5. Sporeoplæsningen (5.5.4) skal præstere et levedygtigt kimtal på 5 til 10 millioner pr. ml på PCA inkuberet ved 63 ± 1 °C i 16 til 18 timer. Sporeoplæsningen skal være ensartet uklar, og hvis der er fnugdannelse eller bundfald, skal den kasseres, og der fremstilles en ny oplæsning fra stamkulturen (5.4.2).
- 5.6. *Fremstilling af reagensglas/ampuller*
- 5.6.1. Agarsubstratet (5.1.2) smeltes og afkøles til 55 °C.
- 5.6.2. 1 del frisk sporeoplæsning (5.5.4) tilsættes til 5 dele agarsubstrat (5.6.1) i et glas eller en flaske, og der blandes grundigt.
- 5.6.3. 0,3 ml af det podede substrat (5.6.2) beregnet til at danne et 5 mm tykt lag overføres til et sterilt glas eller ampul (4.2.6), og der lukkes med en prop, kapsel eller ved smeltning af spidsen. Disse reagensglas/ampuller afkøles i lodret stilling, så næringssubstratet størkner, og det henstår derpå i mindst 12 timer.
- 5.6.4. Reagensglassene/ampullerne kan bruges samme dag, men de kan opbevares i flere måneder, forudsat at de afkøles umiddelbart efter fremstillingen og opbevares ved 0 til 6 °C.
6. *Metodik*
- 6.1. Prøverne kontrolleres så hurtigt som muligt og helst inden 24 timer efter prøveudtagningen, idet de i mellemtiden holdes ved en temperatur på 0 til 5 °C. Hvis det ikke er muligt at kontrollere prøverne inden 24 timer, skal de opbevares i dybfryser (- 30 til - 15 °C) for at reducere inaktiveringen af penicillinet til et minimum.

- 6.2. Hvert glas/ampul (5.6) identificeres tydeligt og på en måde, så det ikke kan slettes. Kapslen eller proppen fjernes. Det antal, der er nødvendigt til undersøgelse af prøverne og kontrollerne (5.2 og 5.3), anbringes i et egnet stativ (4.1.3).
- 6.3. 50 µl af næringsstoffet som beskrevet i 5.1.4 tilsættes til hvert glas/ampul.
- 6.4. Mælkeprøven blandes grundigt, og med sprøjten (4.1.4) overføres 0,1 ml til det tilsvarende mærkede glas/ampul. Der bruges en ren engangsspids til hver prøve, der skal overføres.
- 6.5. Metoden i 6.4 gentages, idet der benyttes standardpenicillinopløsning indeholdende 0,004 µg/ml (= 0,0067 IE/ml) penicillin i stedet for mælkeprøven (5.2.3).
- 6.6. Metoden i 6.4 gentages, idet den inhibitorfri kontrolmælk (5.3) benyttes i stedet for mælkeprøven.
- 6.7. Glassene/ampullerne lukkes, og stativet med glassene/ampullerne anbringes i vandbad ved 63 ± 1 °C (4.1.2) i mindst 2 1/2 til 2 3/4 timer.
- 6.8. Stativet med glassene/ampullerne fjernes fra vandbadet.
- 6.9. Testsubstratets farve (se 7) iagttages.

7. Fortolkning af resultater

- 7.1. Purpurfarvning af testsubstratet i en mælkeprøve eller kontrolglassene/-ampullerne viser, at prøven indeholder antibiotika eller sulfonamider på eller omkring det »helt positive niveau«, der er anført i tabellen på side 39. Farven på glassene/ampullerne med standardpenicillinopløsning (6.5) skal forblive purpur for at vise, at prøvesubstratet er tilstrækkeligt følsomt.
- 7.2. Purpurfarvning af en del af det faste prøvesubstrat eller uregelmæssig farvning i et af mælkeprøveglassene/-ampullerne viser, at der forekommer hæmmende stoffer mellem de niveauer, der er anført i tabellen på side 39.
- 7.3. Gulfarvning af det faste prøvesubstrat i en af mælkeprøverne eller kontrolglassene/-ampullerne angiver, at der ikke er stoffer, der virker hæmmende på testorganismen.
- 7.4. Hvis der sker purpurfarvning i alle de afprøvede glas/ampuller, herunder negativkontrollen, indeholder glassene/ampullerne ikke levedygtige sporer, og prøverne skal kontrolleres igen med nyfremstillet prøvemateriale.

8. Verifikation af resultater

- 8.1. Alle prøver verificeres som beskrevet i 7.1 og 7.2 ifølge »Metode B«. Hvis det er nødvendigt at opbevare mælkeprøver inden verifikationen, skal de dybfryses for at undgå nedbrydning af antibiotika.

B. Metode til verifikation af penicillin og bestemmelse af koncentration

1. Verifikationsundersøgelsens omfang og anvendelsesområde

Dette er en beskrivelse af verifikationsundersøgelsen for penicillin og andre antibiotika end penicillin samt metoden til bestemmelse af penicillin koncentrationen i mælkeprøver med positiv (A.7.1) eller usikker reaktion (A.7.2).

Forskellige antibiotikas følsomhed over for metoden

Se A.1.

2. Definition

- 2.1. Mælkeprøven indeholder antibiotika, herunder sulfonamider, når prøven ved den beskrevne metode giver en klar hæmningszone på mindst 2 mm rundt om disken.

2.2. Hvis en prøve, der indeholder antibiotika, herunder sulfonamider (se 2.1), og hvortil der er tilsat penicillinase (betalaktamase), ikke giver en klar zone eller en klar zone med en mindre diameter end uden penicillinase, er det hæmmende stof enten penicillin eller både penicillin og et andet antibiotikum, herunder sulfonamider.

2.3. Hvis zonen ikke neutraliseres af penicillinase (2.2), er det hæmmende stof i mælkeprøven *andre antibiotika end penicillin*, men det kan være en anden restkoncentration (se direktiv 85/397/EØF, bilag A, kapitel VI, A.1.f) og 2.b)).

Nogle af de semisyntetiske penicilliner, f.eks. natriumcloxacillin, inaktiveres ikke eller kun delvis af penicillinase eller er helt modstandsdygtige og identificeres derfor ikke som penicillin (se 7.3).

3. Princip

En absorberende papirdisk imprægneret med mælken, der skal undersøges, anbringes på overfladen af et agarsubstrat, som er podet med *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Inkubation, der resulterer i organismens normale vækst, gør agaren grumset. Tilstedeværelse i mælken af stoffer, som virker hæmmende på organismernes vækst, angives af en klar zone rundt om disken. Denne klare zones størrelse afhænger bl.a. af koncentrationen og typen af hæmmende stof i mælken.

4. Apparat, glasvarer og udstyr

4.1. Apparat

4.1.1. Se A.4.1.

4.1.2. Vandbad, der kan holde en temperatur på 80 ± 1 °C.

4.2. Glasvarer

Se A.4.2.

4.3. Papirdisk, inhibitorfri, diameter 9 til 13 mm, med en kapacitet på omkring 130 mg (skala 60 til 180 mg) mælk (helst opbevaret i ekssikkator).

5. Substrater, standardopløsninger, penicillinaseopløsning, reagenser, testorganisme m.v.

Bestanddelene i substratet skal være egnet til de bakteriologiske formål. Det anvendte vand skal være glasdestilleret eller demineraliseret til mindst tilsvarende renhed. Det må ikke indeholde stoffer, som virker hæmmende på testorganismer.

5.1. Substrater

5.1.1. Næringsagar (A.5.1.1)

5.1.2. Testsubstrat til påvisning af hæmmende stoffer

Sammensætning

Gærekstrakt	2,5 g
Trypton	5 g
Glukose	1 g
Trimethoprim- eller tetroxoprimopløsning (A.5.1.3)	10 ml
Agar	10 til 15 g (afhængig af gelatinerings- evnen)
Vand	1 000 ml

Fremstilling

De faste bestanddele opløses fuldstændigt i vand ved opvarmning og omrøring, inden trimethoprim- eller tetroxoprimopløsningen tilsættes. Når trimethoprim- eller tetroxoprimopløsningen er tilsat, skal pH-værdien justeres, således at den efter sterilisationen er $8,0 \pm 0,1$ ved 25 °C. Substratet steriliseres i 15 minutter ved 121 ± 1 °C.

5.2. Standardpenicillinopløsninger i mælk

Se A.5.2.

Til kvantitativ bestemmelse af de hæmmende stoffer (8) fremstilles standardpenicillinopløsninger i inhibitorfri mælk (A.5.3) med følgende koncentrationer:

- a) 0,004 µg/ml (0,0067 IE/ml)
- b) 0,006 µg/ml (0,01 IE/ml)
- c) 0,03 µg/ml (0,05 IE/ml)
- d) 0,06 µg/ml (0,1 IE/ml).

5.3. *Penicillinopløsning*

- 5.3.1. En tilstrækkelig mængde penicillinase (betalaktamase) opløses i sterilt, destilleret vand, så der opnås en koncentration på 1 000 enheder/ml. Denne opløsning kan opbevares ved 0 til 5 °C i indtil fire uger, helst fordelt i små portioner.

NB:

Der findes ingen ensartet international standard for penicillinase. Med henblik på denne metode forudsættes det, at 10 enheder penicillinase er tilstrækkeligt til at inaktivere 0,6 µg (= 1 IE) penicillin. For penicillinase af ukendt styrke vil det være nødvendigt at kontrollere, om denne forudsætning er opfyldt. Ellers er det nødvendigt at ændre koncentrationen af penicillinaseopløsningen tilsvarende.

- 5.3.2. I stedet for penicillinaseopløsningen kan der benyttes disks med penicillinase, der fås i handelen, hvis disse efter en kontrolmetode findes at indeholde en passende mængde penicillinase.

5.4. *Testorganisme*

Se A.5.4.

5.5. *Testkultur (sporeoplæsning)*

Se A.5.5.

5.6. *Fremstilling af testplader*

- 5.6.1. Testsubstratet smeltes til påvisning af hæmmende stoffer (5.1.2) og afkøles til 55 °C.
- 5.6.2. 1 del frisk sporeoplæsning (5.5) tilsættes til så mange dele af testsubstratet til påvisning af hæmmende stoffer (5.1.2), som giver en passende kolonitæthed i det podede testsubstrat, og der blandes grundigt.
- 5.6.3. Det podede testsubstrat (5.6.2) overføres til en steril petriskål (A.4.2.2), som i forvejen er opvarmet til 55 °C, så der opnås et lag på 0,6 til 0,8 mm tykkelse. For en petriskål med en indvendig diameter på 140 mm skal der ca. 15 ml prøvesubstrat til en tykkelse på 0,8 mm.
- 5.6.4. Petriskålene overføres til en kold, vandret flade, som tidligere er kontrolleret med en libelle, lågene fjernes, og man lader agarsubstratet størkne. Når substratet er størknet, sættes lågene på skålene, som derefter vendes om for at reducere kondensering på agarsubstratets overflade.
- 5.6.5. De således fremstillede testplader bør benyttes samme dag, men de kan opbevares i indtil to uger, forudsat at de anbringes i en forseglede plasticpose ved 5 °C umiddelbart efter fremstillingen.
- 5.6.6. Bunden af testpladen mærkes med henblik på identifikation af prøverne.

6. **Metodik**

6.1. *Fremstilling af prøve*

- 6.1.1. Prøver, som giver positive eller usikre resultater ved »Metode A« (A.7.1 og A.7.2), skal undersøges igen, identificeres og kvantificeres som penicillin.
- 6.1.2. Mælkeprøverne opvarmes til 80 ± 1 °C i 10 minutter, så påvirkninger fra termolabile, uspecifikke inhibitorer undgås.
- 6.1.3. Efter grundig blanding overføres ca. 10 ml af den opvarmede mælkeprøve til en egnet, steril flaske med bred åbning. Ca. 0,4 ml af penicillinaseopløsningen (5.3) tilsættes mælken, og der blandes grundigt.

- 6.2. *Påvisning af inhibitorer*
- 6.2.1. En papirdisk (4.3) dyppes i mælkeprøven (6.1.2) med en ren, tør pincet. Eventuel overskydende mælk fjernes ved at disken stryges langs randen af prøveflasken. Disken anbringes fladt på testpladen (5.6) og presses forsigtigt ned mod overfladen med pincetten.
- 6.2.2. Der skal være mindst 20 mm mellem disks, der er fremstillet med de forskellige mælkeprøver, ligesom disse skal anbringes mindst 10 mm fra kanten.
- 6.2.3. Til kontrol af følsomheden skal disks (4.3), der er dyppet i standardpenicillinopløsninger (5.2.a)), anbringes vilkårligt mellem mælkeprøvediskene, så de udgør mindst 2 % af mælkeprøvediskene, og der benyttes mindst fem standarddisks for hver undersøgelse.
- 6.2.4. Når alle disks er anbragt vilkårligt på agarsubstratet og er identificeret, vendes pladerne om og inkuberes ved 63 ± 1 °C i 2,5 til 5 timer.
- 6.2.5. Efter inkubationen undersøges pladerne foran en egnet lyskilde for klare hæmningszoner rundt om papirdiskene. De klare zoner måles.
- 6.2.6. Der skal være zoner på mindst 2 mm rundt om diskene, der indeholder standardpenicillinopløsningen (6.2.3).
- 6.2.7. Tilstedeværelsen af klare zoner, der er mindst lige så brede som i 6.2.6, rundt om diskene med mælkeprøven indikerer stoffer, der virker hæmmende på testorganismen.
- 6.3. *Identifikation og kvantificering af det hæmmende stof*
- 6.3.1. Metode 6.2.1 udføres igen på den opvarmede mælkeprøve (6.1.2) og på prøven, som er behandlet med penicillinase (6.1.3). I stedet for at tilsætte penicillinase til 10 ml af mælkeprøven kan en fremstillet penicillinasedisk (5.3.2) dyppes i denne prøve og anbringes på testpladen.
- 6.3.2. Metode 6.2.1 udføres igen for hver standardpenicillinopløsning nævnt i 5.2.a) til d).
- 6.3.3. Gennemsnitsdiametere på de klare hæmningszoner for mælkeprøven og for penicillinasekontrollen samt for standardpenicillinopløsningerne bestemmes.
7. *Fortolkning af resultater (se 2)*
- 7.1. Hvis der ikke er en klar zone rundt om disken med penicillinasekontrollen, men der er en klar zone rundt om disken med mælkeprøven, som er lige så stor eller større end zonen rundt om disken med standardpenicillinopløsningen (5.2.a)), svarer det hæmmende stof i mælkeprøven til en natrium-(kalium)-benzyl-penicillin-koncentration på mindst 0,004 µg/ml.
- 7.2. Hvis gennemsnitsdiametere på den klare zone rundt om disken med penicillinase svarer til gennemsnitsdiametere på den klare zone rundt om disken med mælkeprøven, indeholder mælken hæmmende stoffer, som ikke kan inaktiveres med de penicillinasekoncentrationer, der benyttes ved denne metode.
- 7.3. Hvis gennemsnitsdiametere på den klare zone rundt om disken med penicillinase er mindre end gennemsnitsdiametere på den klare zone rundt om disken med mælkeprøven, som er opvarmet ifølge 6.1.2, indeholder mælkeprøven penicillin samt andre antibiotika, herunder sulfonamider, end penicillin eller semisyntetisk penicillin, som ikke kan identificeres med den penicillinasekoncentration, der benyttes ved denne metode. Syntetiske penicilliner, f.eks. natriumcloxacillin, inaktiveres måske ikke af penicillinase under undersøgelsesbetingelserne og kan derfor klassificeres som andre inhibitorer end penicillin.
- NB:
- Andre hæmmende stoffer end penicillin kan eventuelt identificeres ved egnede metoder.
8. *Bestemmelse af penicillinindholdet*
- 8.1. Penicillinindholdet kan bestemmes enten ved tegning af en standardkurve eller ved beregning på grundlag af de zonestørrelser, der er opnået med standardpenicillinopløsningerne (5.2.a) til d)).

8.2. Tegning af en standardkurve

Da der er lineær korrelation mellem 1 og 10 af penicillinkoncentrationen og hæmningszonernes diameter, kan standardkurven tegnes på semilogaritmisk papir med penicillinkoncentrationerne som den logaritmiske ordinat og hæmningszonerne som abscissen. Hæmningszonerne beregnes som gennemsnit af dobbeltprøverne. Hæmningszonernes diameter plottes i forhold til standardpenicillinkoncentrationerne, og standardkurven tegnes.

8.3. Beregning

Penicillinkoncentrationerne i mælkeprøven kan beregnes på grundlag af deres zonediameter ved hjælp af ligningen eller standardkurven. For at opnå en nøjagtig bestemmelse skal hæmningszonernes radius være mindst to gange og højst fem gange større end diskenes radius.

9. Angivelse af resultater

9.1. Resultaterne udtrykkes som penicillinindhold lig med eller over 0,004 µg/ml (eller ved angivelse af den bestemte koncentration) eller som indhold af andre inhibitorer end penicillin.

9.2. Repeterbarhed (*r*) og reproducerbarhed (*R*)

Der findes ingen tal, og de ville ikke give mening, da der benyttes en standard til sammenligning.

IX. PÅVISNING AF PATOGENE MIKROORGANISMER**1. Omfang og anvendelsesområde**

I henhold til kravet i direktiv 85/397/EØF, bilag A, kapitel VII, punkt 2, beskrives her de forskrifter, der skal følges, når pasteuriseret mælk kontrolleres for patogene mikroorganismer.

2. Definition

Der skal undersøges for de bakteriearter, som hyppigst fremkalder levnedsmiddelbårne sygdomme.

Pasteurisering er en sikkerhedsforanstaltning mod tilstedeværelse af ikke-termoresistente patogene kim i mælk. Hvis normerne, der er fastlagt i direktiv 85/397/EØF, bilag A, kapitel VII, punkt 2, for kimtal ved 30 °C og 21 °C, fosfatase og coliforme bakterier, opfyldes, er en særlig prøve for patogene kim kun nødvendig i tilfælde af mistanke om, at mælken har forbindelse med tilfælde af madforgiftning.

3. Metodik

Undersøgelsesmetoder og -hyppighed skal fastlægges af den nationale myndighed på en sådan måde, at det bliver muligt at udstede hygiejnecertifikater vedrørende varmebehandlet mælk med henblik på handel inden for Fællesskabet. Til påvisning af patogene mikroorganismer gælder eventuelle internationalt godkendte kriterier og metoder.

4. Resultatrapport

For hver undersøgt patogen mikroorganisme skal resultatet angives på følgende måde:

Antal pr. ml mælk eller »Tilstedeværelse« eller »Manglende tilstedeværelse« i den mængde pasteuriseret mælk, der kræves til den anvendte metode. Rapporten skal klart beskrive den anvendte metode.
