

31991D0180

1991 4 13

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

L 93/1

KOMISIJOS SPRENDIMAS

1991 m. vasario 14 d.

nustatantis tam tikrus žalio ir termiškai apdoroto pieno tyrimų ir analizės metodus

(91/180/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1985 m. rugpjūčio 5 d. Tarybos Direktyvą 85/397/EEB dėl žmonių ir gyvūnų sveikatos įtakos prekybai termiškai apdorotu pienu Bendrijoje ⁽¹⁾ su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 89/662/EEB ⁽²⁾, ir ypač į jos 10 (2) straipsnį,

kadangi 10 (2) straipsnis numato, jog Komisija turi išdėstyti tyrimų ir analizės metodus, naudojamus kontroliuoti atitiktį žalio ir termiškai apdoroto pieno standartams;

kadangi yra būtina pateikti metodus, taikomus nustatyti žaliame piene mikroorganizmų skaičių lėkštelėje, ląstelių skaičių, užšalimo temperatūrą ir antibiotikus;

kadangi yra būtina pateikti metodus, taikomus nustatyti pasteriizuotame piene patogeninius mikroorganizmus, koliforminių bakterijų skaičių, mikroorganizmų skaičių lėkštelėje, fosfatazę, peroksidazę, antibiotikus ir užšalimo temperatūrą;

kadangi yra būtina sterilizuotam ir ultraaukštoje temperatūroje apdorotam pienui pateikti metodus ir ypač nustatyti mikroorganizmų skaičių lėkštelėje ir antibiotikus;

kadangi dėl techninių priežasčių yra galimybė pirmiausia pateikti tyrimų ir analizės pamatinius metodus, užtikrinančius atitiktį tam tikriems standartams, kadangi yra ypač svarbu toliau tirti sąlygas,

kuriuose turi būti taikomi įprastiniai analitiniai tyrimų metodai; kadangi laukiant šio tyrimo rezultatų, valstybės narės privalo naudoti atitinkamus įprastinius metodus, užtikrinančius atitiktį Direktyvoje 85/397/EEB nurodytiems standartams;

kadangi tyrimų ir analizės pamatinių metodų nustatymas apima ir analitinių procedūrų, kurių būtina laikytis, nustatymą bei tikslumo kriterijų išdėstymą, užtikrinančių vienodą rezultatų aiškumą;

kadangi šiame sprendime numatytos priemonės atitinka Nuolatinio veterinarijos komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

1 straipsnis

Žaliame pienui taikomi šie tyrimų ir analizės pamatiniai metodai:

- užšalimo temperatūros nustatymas,
- mikroorganizmų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas lėkštelėje 30 °C temperatūroje,
- somatinių ląstelių skaičiaus nustatymas,
- antibiotikų ir sulfamidų nustatymas.

⁽¹⁾ OL L 226, 1985 8 24, p. 13.

⁽²⁾ OL L 395, 1989 12 30, p. 13.

2 straipsnis

Pasterizuotam pienui taikomi šie tyrimų ir analizės pamatiniai metodai:

- užšalimo temperatūros nustatymas,
- fosfatazės aktyvumo nustatymas,
- peroksidazės aktyvumo nustatymas,
- mikroorganizmų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas lėkštelėje 30 °C temperatūroje,
- mikroorganizmų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas lėkštelėje 21 °C temperatūroje,
- koliforminių bakterijų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas lėkštelėje 30 °C temperatūroje,
- antibiotikų ir sulfamidų nustatymas,
- patogeninių mikroorganizmų nustatymas.

3 straipsnis

Sterilizuotam ir ultraaukštoje temperatūroje apdorotam pienui taikomi šie tyrimų ir analizės pamatiniai metodai:

- mikroorganizmų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas lėkštelėje 30 °C temperatūroje,
- užšalimo temperatūros nustatymas,
- antibiotikų ir sulfamidų nustatymas.

4 straipsnis

Šių pamatinių tyrimų analizės ir metodų tikslumo kriterijai, tyrimų protokolo bendrieji reikalavimai ir mėginių surinkimas atliekamas pagal 1 priede nustatytas taisykles.

5 straipsnis

Tyrimų ir analizės pamatiniai metodai, nurodyti 1, 2 ir 3 straipsniuose, yra išdėstyti 2 priede.

6 straipsnis

Šis sprendimas turi būti persvarstytas iki 1992 m. gruodžio 31 d., siekiant atsižvelgti į mokslo ir techninę pažangą.

7 straipsnis

Šis sprendimas skirtas valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1991 m. vasario 14 d.

Tarybos vardu

Komisijos narys

Ray MAC SHARRY

*I PRIEDAS***TURINYS**

	Psl.
I. Bendrosios nuostatos	187
II. Žalio ir termiškai apdoroto pieno mėginių ėmimas	189

I. BENDROSIOS NUOSTATOS

1. Įvadas

Aprašytos reagentų, įrangos, rezultatų išraiškos, tikslumo ir tyrimų protokolų bendrosios nuostatos. Valstybių narių kompetentingos institucijos ir vykdančiosios laboratorijos, atsakingos už pieno mėginių ėmimą ir tyrimus, privalo laikytis bendrųjų nuostatų.

2. Reagentai

2.1. Vanduo

2.1.1. Kuomet yra minimas vanduo, skirtas tirpinimo, skiedimo ar plovimo tikslams, nesant kitų nurodymų, turi būti vartojamas distiliuotas, dejonizuotas arba bent jau demineralizuotas arba ekvivalentiško grynumo vanduo. Mikrobiologiniams tikslams jis turi būti be medžiagų, kurios galėtų paveikti arba turėti įtakos mikroorganizmų augimui tyrimo sąlygomis.

2.1.2. Kuomet yra nuoroda į „tirpinimą“ ar „skiedimą“, nesant kokių kitų nurodymų, turima omeny „tirpinimas vandenyje“ ar „praskiedimas vandeniu“.

2.2. Reagentai.

Nesant kitų nurodymų, visi naudojami reagentai turi būti analizinio grynumo.

3. Įranga

3.1. Įrangos sąrašai

Skirtinguose pamatiniuose metoduose pateiktuose įrangos sąrašuose yra tik specialios paskirties ir konkrečioms techninėms reikavimams skirta įranga.

3.2. Analizinės svarstyklės

Analizinės svarstyklės yra svarstyklės, galinčios sverti 0,1 mg tikslumu.

4. Rezultatų išraiška

4.1. Rezultatai

Nesant kitokių nurodymų, analitinis rezultatas protokole turi būti pateikiamas kaip aritmetinis vidurkis, gautas iš dviejų tyrimų, kurie atitinka rezultatų pakartojamumo kriterijų. Jeigu rezultatų pakartojamumo kriterijus nėra įvykdytas, tuomet tyrimas turi būti pakartotas arba rezultatai paskelbti negaliojančiais.

4.2. Procentų skaičiavimas

Jeigu kitaip nenurodyta, rezultatas turi būti paskaičiuotas kaip mėginio masės procentas.

5. Tikslumo kriterijai: rezultatų pakartojamumas ir rezultatų atkuriamumas.

5.1. Kiekvieno metodo tikslumo kriterijai apibūdinami tokiu būdu:

5.1.1. Rezultatų pakartojamumas (r) yra vertė, žemiau kurios yra dviejų atskirų tyrimų, gautų naudojant tą patį mėginį, tą patį metodą, tomis pačiomis sąlygomis (tas pats analitikas, ta pati įranga, ta pati laboratorija ir trumpas laiko tarpas tarp tyrimų) absoliutus rezultatų skirtumas.

5.1.2. Rezultatų atkuriamumas (R) yra vertė, žemiau kurios yra dviejų atskirų tyrimų, gautų naudojant tą patį mėginį, tą patį metodą ir skirtingomis sąlygomis (skirtingas analitikas, skirtinga įranga, skirtingos laboratorijos ir (arba) skirtingas laiko tarpas tarp tyrimų) absoliutus rezultatų skirtumas.

- 5.1.3. Nesant kitų nurodymų, kiekvienam metodui atitinkamuose punktuose nurodytos pakartojamumo ir atkuriamumo kriterijų vertės išreiškia 95 % tikimybės lygio intervalus, apibrėžtus ISO 5725 1986 m. antrajame leidinyje. Jos yra skaičiuojamos iš pripažintų tarplaboratorinių tyrimų rezultatų, panaudotų įvertinti metodą. Tačiau kai kuriems metodams bendri bandymai nebuvo atlikti. Šiuo atveju pakartojamumo ir atkuriamumo vertės yra paskaičiuojamos.

- 5.1.4. 5.1.3. punkte nurodyti tarplaboratoriniai tyrimai ir studijos turi būti planuojami ir atliekami pagal tarptautinius nurodymus.

6. **Bandymo protokolas**

Bandymo protokole smulkiai aprašomi taikyti analizės metodai ir gauti rezultatai. Be to, jame pateikiamos visos procedūros detalės, kurios nėra aprašytos analizės metode arba yra pasirinktinės, taip pat ir visos kitos aplinkybės, kurios gali turėti įtakos gautiems rezultatams. Bandymo protokole pateikiama visa visiškam mėginio identifikavimui būtina informacija.

II. ŽALIO IR TERMIŠKAI APDOROTO PIENO MĖGINIŲ ĖMIMAS

1. Taikymo sritis

Šis pamatinis metodas taikomas žalio ir termiškai apdoroto pieno mėginių ėmimui. Mėginių ėmimo, saugojimo ir transportavimo procedūros yra taikomos gamintojo pristatytam žaliame pienui, taip pat žaliame ir termiškai apdorotame pienui, esančiam saugojimo ir transportavimo cisternose.

2, 4.4, 5 ir 6 punktuose pateiktos procedūros yra taikomos termiškai apdoroto tiesioginiam vartojimui skirtam pieno mėginių ėmimui.

2. Bendrieji reikalavimai

Žalio ir termiškai apdoroto pieno, esančio bidonuose, cisternose ir kt., mėginius turi paimti igudęs, prieš tai tinkamai apmokytas darbuotojas.

Esant reikalui, įgaliotos valstybės institucijos arba bandymų laboratorija turi instrukuoti mėginius imančią personalą dėl mėginių ėmimo metodų, siekiant užtikrinti, kad mėginys atstovautų visą siuntą ir atitiktų ją.

Jei būtina, įgaliota valstybės institucija arba bandymų laboratorija turi instrukuoti mėginius imančią personalą apie mėginio ženklavinimą, siekiant užtikrinti nedviprasmišką mėginio identifikavimą.

3. Mėginių ėmimo įranga

3.1. Bendrieji klausimai

Mėginių ėmimo įranga turi būti pagaminta iš nerūdijančio plieno arba kitos reikiamo stiprumo medžiagos, jos konstrukcija turi atitikti numatytą paskirtį (maišymui, mėginių ėmimui ir kt.). Nardinamosios maišyklės ir maišytuvai, skirti maišyti skysčiams induose, privalo turėti pakankamą plotą, kad tolygiai sumaišytų visą pieną, bet nesukeltų gaisaus kvapo. Samtis privalo turėti tvirtą pakankamo ilgio rankeną, kad būtų galima paimti mėginį iš bet kokio gylio indo. Samčio talpa neturi būti mažesnė nei 50 ml.

Mėginių indai ir dangčiai turi būti stikliniai arba pagaminti iš tinkamo metalo ar plastiko.

Medžiagos, iš kurių yra pagaminta mėginių ėmimo įranga, įskaitant indus ir dangčius, neturi sukelti bet kokių mėginio pokyčių, kurie galėtų paveikti tyrimų rezultatus. Visi mėginių ėmimo įrangos ir taros paviršiai turi būti švarūs, sausi, lygūs, be įtrūkimų, su užapvalintais kampais.

3.2. Mėginių ėmimo įranga mikrobiologiniams tyrimams.

Mėginių ėmimo įranga, įskaitant ir indus, išskyrus 3.1 punkte pateiktus reikalavimus, turi būti ir sterili.

Jeigu ta pati mėginių ėmimo įranga yra naudojama ir kitam mėginių ėmimui, po kiekvieno mėginio paėmimo ji turi būti nuplauta ir sterilizuojama pagal tyrimų laboratorijos ar įgaliotos valstybės institucijos nurodymus ar reikalavimus, kad būtų išsaugotas vienas po kito imamų mėginių švarumas.

4. Mėginių ėmimo metodika

4.1. Bendrieji reikalavimai

Nežiūrint į tai, kokie bus atliekami tyrimai, pienas prieš mėginių ėmimą turi būti kruopščiai sumaišytas rankiniu ar mechaniniu būdu.

Mėginys turi būti paimtas tuoj pat po sumaišymo, pienui dar tebesant sumaišytam.

Kai iš cisternos tuo pačiu metu imama keletas pieno mėginių, pirmiausia turi būti paimtas mėginys mikrobiologiniam tyrimui.

Mėginio dydis turi atitikti tyrimo reikalavimus. Mėginiams naudojamo indo talpa turi būti tokia, kad mėginys beveik ją pilnai užpildytų, tuo būdu sudarant galimybę tinkamai susimaišyti turiniui prieš tyrimą ir vengti sviesto grūdelių susidarymo pervežant.

4.2. Rankinis mėginių paėmimas

4.2.1. Mėginių paėmimas iš pieno kibirų ir bidonų

Norint greitai sumaišyti pieną kibire ar bidone, nardinamoji maišyklė judinama aukštyn ir žemyn, užtikrinant, kad pienas, reikiamai susimaišytų ir kad grietinė nepriliptų prie bidono kaklo. Visą siuntą atstovaujantis mėginys turi būti paimtas kaip nurodyta 4.2.4 punkte.

4.2.2. Mėginių paėmimas iš fermos atšaldyto pieno cisternų ar statinių

Pienas maišomas mechaniniu ar rankiniu būdu, kol jis tampa pakankamai homogeniškas.

Jeigu pieno tūris yra toks, kad mechaninis maišytuvas negali išmaišyti pieno, pienas sumaišomas rankiniu būdu.

4.2.3. Mėginių ėmimas iš svėrimo indo

Labai svarbu, kad supiltas į svėrimo indą pienas būtų reikiamai sumaišytas. Siekiant užtikrinti tolygų riebalų pasiskirstymą gali prireikti panaudoti papildomą rankinį ar mechaninį maišymą. Kada pieno siuntos, iš kurios reikia paimti mėginį tūris viršija svėrimo indo talpą, visos siuntos reprezentatyvusis mėginys turi būti paimtas, kaip nurodyta 4.2.4 punkte.

4.2.4. Mėginių paėmimas iš pieno tūrio, esančio keliuose induose

Kada pieno kiekis, iš kurio reikia paimti mėginius, yra ne viename inde, reprezentatyvusis kiekis paimamas iš kiekvieno indo ir pažymimas pieno kiekis, kuriam priklauso kiekvienas mėginys. Jeigu mėginių, paimtų iš kiekvieno indo, nereikia tirti atskirai, šių reprezentatyviųjų kiekių porcijos sumaišomos tokiais kiekiais, kurie yra proporcingi kiekiui pieno inde, iš kurio buvo paimtas kiekvienas mėginys. Sumaišius mėginys (-iai) paimami iš šių proporcingų kiekių.

4.2.5. Mėginių paėmimas iš didelių talpų — saugyklų, geležinkelio ir automobilių cisternų

4.2.5.1. Prieš paimant mėginius, pienas tinkamai sumaišomas.

Dideliuose induose, saugyklose, geležinkelio ar automobilių cisternose esančiam pienui sumaišyti yra rekomenduojama naudoti mechaninį sumaišymo būdą (4.2.5.2).

Sumaišymo laipsnis turi atitikti laiko tarpą, kurio metu pienas buvo ramybės būklėje. Kiekviena konkrečiu atveju turi būti pademonstruojama, kad sumaišymo efektyvumas yra tinkamas numatytai analizei atlikti; sumaišymo efektyvumo kriterijus turi ypač didelę įtaką analitinių rezultatų, gautų iš mėginių, paimtų iš skirtingų siuntos vietų, arba iš cisternos išpylimo angos, tam tikrais intervalais išpilant pieną, panašumui. Pieno sumaišymo būdas yra laikomas efektyviu, jei dviejų šiomis sąlygomis paimtų mėginių riebalų kiekio skirtumas yra mažesnis kaip 0,1 %.

Dideliame inde su dugne esančia išleidimo anga išleidimo vietoje gali būti mažas pieno kiekis, kuris netgi po sumaišymo negali būti laikomas reprezentatyviu viso kiekio mėginiu. Todėl mėginius geriau imti per apžiūros angą. Jeigu mėginiai yra imami per išleidimo angą, norint užtikrinti, kad tie mėginiai reprezentuotų visą kiekį, turi būti leidžiama nubėgti pakankamam pieno kiekiui.

4.2.5.2. Didelių kiekių, saugyklų, geležinkelio ar automobilių cisternų turinį galima sumaišyti:

- cisternose įmontuotu mechaniniu maišytuvu su elektros variklio pavara,
- maišyklėmis su propeleriu, varomomis elektriniu motoru ir uždėtomis ant apžiūros angos taip, kad maišyklė būtų panardinta piene,
- pieno recirkuliacijos būdu (geležinkelio ir automobilių cisternų atveju) per perpylimo žarną, pritvirtintą prie cisternos iškrovos siurblių ir įleistą per apžiūros angą,
- švriu filtruotu suspaustu oru. Šiuo atveju siekiant išvengti kartaus skonio, turi būti naudojamas minimalus oro slėgis ir tūris.

4.3. Automatinis ar pusiau automatinis mėginių ėmimas

Automatiniai ar pusiau automatiniai įtaisai mėginiams paimti iš gamintojo pristatyto šviežio pieno turi būti naudojami pagal bandymų laboratorijos ar kitos įgaliotos valstybės institucijos pateiktus nurodymus.

Ši įranga turi būti atitinkamai bandoma prieš pradedant ją naudoti, taip pat reguliariai bandoma, kuomet ji yra naudojama pagal įgaliotos valstybės institucijos nurodymus. Mėginio ėmimo procedūros tinkamumas turi būti tikrinamas siekiant nustatyti:

- minimalų surinkto pieno tūrį, iš kurio galima tinkamai paimti mėginį,
- bet kurio likučio proporciją, kuri yra susijusi su minimaliu mėginio tūriu,
- galimybę paimti visos masės reprezentatyvų mėginį po tinkamo sumaišymo.

Kada yra naudojama automatinė ar pusiau automatinė mėginių ėmimo įranga, įgaliota valstybės institucija gali nurodyti:

- minimalų pieno tūrį, iš kurio turi būti paimti mėginiai,
- minimalų mėginio tūrį,
- maksimalų likutį,
- kokia analizė gali būti atlikta ir kokių reikia imtis atsargos priemonių.

4.4. *Termiškai apdoroto pieno, skirto tiesioginiam naudojimui ir esančio mažmeninės prekybos įpakavime, mėginių paėmimas*

Termiškai apdoroto, skirto tiesioginiam naudojimui ir esančio prekinėje taroje pieno mėginį turi sudaryti nepažeista pakuotė. Esant galimybei, mėginiai turi būti paimti iš įpakavimo mašinos ar įmonės šalto kambario kiek galint greičiau po perdirbimo. Pasterizuotam pienui tai turi būti atlikta apdorojimą dieną.

Bet kurio termiškai apdoroto pieno tipo (pasterizuoto, ultraaukštoje temperatūroje apdoroto ir sterilizuoto) imamų mėginių skaičius atitinka tyrimų, kurie bus atliekami pagal tyrimų laboratorijos ar įgaliotos valstybės institucijos, nurodymus.

5. **Mėginio identifikavimas**

Mėginys turi būti paženklintas identifikavimo numeriu, tokiu būdu, kad naudojantis tyrimų laboratorijos ar įgaliotos valstybės institucijos nurodymais, jį būtų galima lengvai atpažinti (žr. 2).

6. **Mėginių pervežimas ir laikymas**

Tyrimų laboratorija pagal pieno tipą ir naudojamą analizės metodą turi parengti nurodymus dėl pieno pervežimo sąlygų, laikymo, periodo tarp mėginių ėmimo ir analizės. Nurodymai turi būti išdėstyti pagal įgaliotos valstybės institucijos reikalavimus.

Nurodymuose turi būti pateikti šie reikalavimai:

- pervežimo ir laikymo metu turi būti imamasi apsaugos priemonių, siekiant išvengti užteršimo kvapais ir tiesioginės saulės šviesos poveikio. Jei indas, kuriame yra laikomi mėginiai, yra persišviečiantis, jis turi būti laikomas tamsioje vietoje,
- žalio pieno mėginiai, skirti mikrobiologinei analizei, turi būti pervežami ir laikomi esant temperatūrai nuo 0 °C iki 4 °C. Laiko tarpas tarp mėginių ėmimo ir analizės turi būti kiek galint trumpesnis ir jokių būdu ne ilgesnis kaip 36 valandos. Įgaliota valstybės institucija gali priimti laikymo temperatūrą tarp 0 °C ir 6 °C, jeigu laiko tarpas tarp mėginio ėmimo ir analizės ne ilgesnis kaip 24 valandos,
- mikrobiologinei analizei skirti pasterizuoto pieno mėginiai turi būti pervežami ir laikomi esant temperatūrai tarp 0 °C ir 4 °C. Laiko tarpas tarp mėginių ėmimo ir analizės turi būti kiek galint trumpesnis ir jokių būdu neviršijantis 24 valandų,
- kiti nei pasterizuoto žalio pieno mėginiai, skirti mikrobiologinei analizei, turi būti laikomi laboratorijoje atšaldyti, ir laiko tarpas tarp mėginio ėmimo ir analizės turi būti kiek galint trumpesnis.

Pagal įvairias procedūras kai kurioms analizėms yra taikomos specialios apsaugos priemonės.

II. PRIEDAS

TURINYS

	Psl.
I. Užšalimo temperatūros nustatymas	193
II. Fosfatazės aktyvumo nustatymas	199
III. Peroksidazės aktyvumo nustatymas	202
IV. Mikroorganizmų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas 30 °C temperatūroje ...	203
V. Mikroorganizmų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas 21 °C temperatūroje ...	208
VI. Koliforminių bakterijų skaičiaus nustatymas pagal skaičiuojamas kolonijas 30 °C temperatūroje	212
VII. Somatinių ląstelių skaičiaus nustatymas	216
VIII. Antibiotikų ir sulfamidų nustatymas	222
IX. Patogeninių mikroorganizmų nustatymas	231

I. UŽŠALIMO TEMPERATŪROS NUSTATYMAS

1. Taikymo sritis

Ši procedūra yra žalio, pasterizuoto, ultraaukštoje temperatūroje apdoroto ir sterilizuoto nenugriebto, pusriebio ir nugriebto pieno užšalimo temperatūros nustatymo pamatinis metodas, naudojant aparatą (termistorinį krioskopą), kuriame termostatiškai valdoma vonia yra atšaldoma elektriniu būdu ir termistorinis zondas pakeičia gyvsidabrio termometrą.

Yra dviejų tipų prietaisai. Pirmasis prietaisas rodo aukščiausią užšalimo temperatūrą ant užšalimo kreivės plokščiojoje dalyje, tuo tarpu kitas prietaisas komerciniais tikslais yra sureguliuotas teikti parodymus nustatytu laiku prasidėjus užšalimui. Kadangi užšalimo temperatūros kreivės skirtingam pieno tipui arba pienui ir etaloniniam skiediniui, naudojamam kalibravimui, gali skirtis, šiame pamatiniame metode reikalaujama naudoti kreivės rodančius prietaisus.

Prietaisai su nustatytu laiku gali būti naudojami įprastiniams analitiniams matavimams. Užšalimo temperatūra naudojama nustatyti pašalinio vandens proporciją piene, su sąlyga, kad mėginio rūgštingumas neviršija 0,18 g pieno rūgšties 100 ml (žr. 7.4) pieno.

2. Apibrėžimas

Pieno užšalimo temperatūra — vertė, gauta matuojant pagal aprašytą metodą, išreikšta Celsijaus laipsniais (°C).

3. Principas

Pieno mėginys yra smarkiai ataušinamas iki atitinkamos temperatūros priklausomai nuo prietaiso, ir mechaninių vibracijų būdu yra sukeliami kristalizacija, kuri iššaukia greitą temperatūros pakilimą iki kreivės plokščiosios srities, ir tai atitinka mėginio užšalimą.

Prietaisas yra kalibruojamas reguliuojant, kad jis turėtų teisingus parodymus dviems etaloniniams skiediniams, naudojant tą pačią procedūrą kaip, ir pieno mėginiams. Esant šioms sąlygoms, kreivės plokščioji sritis rodo pieno užšalimo temperatūrą Celsijaus laipsniais.

4. Prietaisai ir stikliniai indai.

Paprastai naudojama ši laboratorinė įranga:

4.1. Krioskopas

Krioskopas susideda iš termostatu valdomos aušinimo vonios, termistorinio zondo (puslaidininkinio varžos termometro) su jo grandine ir galvanometro ar automatinio atskaitos įtaiso, mėginių maišytuvo bei prietaiso šaldymui pradėti kartu su mėgintuvėliais.

4.1.1. Aušinimo vonia

Gali būti naudojami du aušinimo vonių tipai.

4.1.1.1. Panardinamasis tipas

Gera izoliuota vonia su atitinkamu aušinimo skysčiu, kuris yra taip sumaišytas, kad temperatūros skirtumas tarp dviejų skirtingų temperatūrų skystyje neviršija 0,2 °C. Skysčio temperatūra neturi svyruoti daugiau nei $\pm 0,5$ °C nuo gamintojo nustatytos vertės.

Svarbu palaikyti skystį aušinimo vonioje pastoviam lygyje. Visas mėgintuvėlio paviršius žemiau tūrio ženklo turi būti panardintas į aušinimo skystį.

4.1.1.2. Cirkuliacinis tipas

Nenutrūkstama atitinkamo aušinimo skysčio srovė cirkuliuoja aplink mėgintuvėlį. Skysčio temperatūra neturi svyruoti daugiau kaip $\pm 0,5$ °C gamintojo nurodytos vertės atžvilgiu.

Tinkamas aušinimo skystis yra 33 % (pagal tūrį) etano 1,2 diolio (etileno glikolio) vandeninis tirpalas.

4.1.2. Termistorius ir jo grandinė

Termistorius turi būti stiklinio zondo tipo, kurio skersmuo neviršija $1,80 \pm 0,2$ mm ir pagrindinis skersmuo neviršija $0,31$ mm. Termistoriaus laiko konstanta turi būti mažesnė kaip dvi sekundės ir β vertė (žr. pastabą) turi būti aukšta. Darbo įtampa, srovė ir sklaidos konstanta turi būti tokie, kad termistoriaus temperatūra nepakiltų daugiau nei $0,0005$ °C virš jo supančios aplinkos esant $-0,512$ °C. Maksimali varžos paklaida turi būti ± 5 %.

Kai zondas yra darbo padėtyje krioskope, stiklinio korpuso galas turi būti mėgintuvėlio ašyje ir $44,6 \pm 0,1$ mm žemiau mėgintuvėlio viršaus (žr. 15 psl.). Reikalingas šablonas vartotojui padedantis įstatyti zondą į šią padėtį.

Pastaba

β apibūdina termistoriaus varžos temperatūrinę charakteristiką pagal formulę:

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

čia:

T temperatūra Kelvinais,

R varža omais, kai temperatūra yra T,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} \text{ temperatūrinis varžos koeficientas;}$$

β konstanta, priklausanti nuo termistoriaus medžiagos. Šiuolaikinėje praktikoje rekomenduojama, kad dydis β būtų didesnis kaip 3 000.

4.1.3. Matavimo įtaisas ir automatinis atskaitos įtaisas

4.1.3.1. Matavimo principas

Naudojamas prietaisas turi užregistruoti pirmąją plokščiąją sritį užšalimo temperatūros kreivėje. Plokščioji sritis yra kreivės dalis, kurioje temperatūra išlieka pastovi $\pm 0,002$ °C ribose ne mažiau kaip 20 sekundžių.

4.1.3.2. Rankinis atskaitos įtaisas

Termistoriaus varža turi būti išlyginama *Wheatstone* tiltu ar panašiu prietaisu, panaudojant aukščiausios kokybės stabilus rezistorius, kurių paklaida nedidesnė nei ± 10 % ir kurių temperatūros koeficientas neviršija 2×10^{-5} °C.

Kintamasis (svyruojantis) rezistorius neturi nukrypti nuo tiesiškumo visame jo ruože daugiau nei 0,3 % nuo jo maksimalios vertės.

Turi būti rezistorių reguliavimo priemonės skirtos kalibravimo tikslams.

Matavimo skalė turi būti suskirstyta intervalais ne didesniais kaip 0,001 °C.

4.1.3.3. Automatinis atskaitos įtaisas

Automatinio atskaitos įtaiso skiriamoji galia temperatūros diapazone nuo 0 iki -1 °C turi būti ne mažesnė kaip 0,001 °C.

Automatinio atskaitos įtaiso ir jo grandinės stabilumas turi būti toks, kad tos pačios temperatūros vienas po kito einančios nuorodos nesiskirtų daugiau kaip 0,001 °C.

Grandinės tiesiškumas turi būti toks, kad prietaisui teisingai dirbant, nebūtų įvesta jokia paklaida didesnė kaip $\pm 0,001$ °C bet kuriame diapazono taške nuo $-0,400$ °C iki $-0,600$ °C.

4.1.4. Maišymo viela

Mėginiui maišyti yra naudojama pienui inertiška 1–1,5 mm skersmens metalinė viela.

Maišymo viela turi būti pakoreguota pagal amplitudę ir turi būti įmontuota vertikaliai esant jos apatiniam galui lygiai su termistoriaus zondo viršūne. Leidžiama 1,5 mm paklaida aukščiau ar žemiau šios padėties.

Maišymo viela turi vibruoti į šonus su pakankama gamintojo nustatyta amplitudė (bet ne mažesne kaip $\pm 1,5$ mm), siekiant užtikrinti tolygią mėginio temperatūrą rezultato nustatymo metu. Normaliai maišant maišymo viela niekada neturi liesti termistoriaus zondą arba mėgintuvėlio sienelę.

4.1.5. Įtaisas užšaldymui pradėti

Tai gali būti bet koks įtaisas, kurį paleidus į darbą iš karto prasideda mėginio užšaldymas ir mėginio temperatūra kyla link užšalimo temperatūros. Šiam tikslui gali būti panaudota maišymo viela; vienas būdas yra padidinti vibravimo amplitudę nuo vienos iki dviejų sekundžių, tokiu būdu, kad maišymo viela atsitrenktų į mėgintuvėlio sienelę.

4.1.6. Mėgintuvėliai

Mėgintuvėliai (žr. 1 pav.) turi būti stikliniai, jų ilgis turi būti $50,8 \pm 0,1$ mm; išorinis skersmuo – $16,0 \pm 0,1$ mm, o vidinis skersmuo $13,5 \pm 0,1$ mm. Sienelės storis per visą mėgintuvėlį neturi skirtis daugiau kaip 0,1 mm.

29,8 mm nuo mėgintuvėlio viršaus (21 mm virš mėgintuvėlio dugno) turi būti tūrio ženklas, rodantis mėginio tūrį $2,5 \pm 0,1$ ml.

4.1.7. Elektrinis maitinimas

Maitinimo įtampa turi būti stabilizuota aparato viduje arba išorėje, tokiu būdu, kad esant tinklo įtampos $\pm 6\%$ svyravimui, maitinimo įtampos svyravimai nebūtų didesni kaip $\pm 1\%$ įvardintos vertės.

4.2. Analizinės svarstyklės

4.3. 1 000 ml talpos vienaženklės tūrio matavimo kolbos, A klasės.

4.4. Gerai ventiliuojama džiovinimo krosnis, palaikanti 130 ± 1 °C temperatūrą arba

ventiliuojama elektrinė krosnis, palaikanti 300 ± 25 °C temperatūrą.

4.5. Džiovintuvas

5. Reagentai

5.1. Boro silikatinio stiklo inde distiliuotas vanduo, užvirintas ir atšaldytas iki 20 ± 2 °C kolboje, kurioje yra anglies dvideginį absorbuojantis vamzdelis.5.2. Natrio chloridas, analizinio grynumo, smulkiai sumaltas, džiovintas penkias valandas krosnyje 300 ± 25 °C temperatūroje arba alternatyviu būdu išdžiovintas krosnyje 130 ± 1 °C temperatūroje mažiausiai 24 valandas ir atšaldytas iki kambario temperatūros eksikatoriuje.

5.3. Etaloninių tirpalų paruošimas

Svėrimo indelyje pasveriamas atitinkamas kiekis (žr. 1 lentelę) sauso natrio chlorido (5.2). Ištirpinama distiliuotame vandenyje (5.1), perpilama į 1 000 ml vienaženklę matavimo kolbą ir praskiedžiama iki žymės 20 ± 2 °C temperatūros vandeniui.

Laikoma 5 °C temperatūroje gerai užkimštuose polietilenuose buteliuose, kurių talpa neviršija 250 ml, ne ilgiau kaip 2 mėnesius.

Natrio chlorido tirpalų užšalimo temperatūros 20 °C temperatūroje

Na Cl, g/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

Prieš naudojant etaloninį tirpalą, butelis iš lėto apverčiamas ir sukamas keletą kartų, kad gerai susimaišytų jo turinys. Etaloninis tirpalas niekada neturi būti smarkiai maišomas, kad nepatektų į jį oras.

Etaloninio tirpalo mėginiai išpilami iš butelio, supilant šį tirpalą į švarią sausą stiklinę, jokių būdu šiam tikslui negalima naudoti pipetės.

Neturi būti naudojami tirpalai, paimti iš butelių, kuriuose yra mažiau nei ketvirtadalis kiekio ir jeigu nėra konservuoti fungicidu (pvz. tiomersalo tirpalu, 10 g/l), jie neturi būti naudojami ilgiau kaip du mėnesius.

6. Termistorinio krioskopos kalibravimas

Krioskopas turi būti įrengtas tokiu būdu, kad aplinkos oro temperatūra nepakistų daugiau nei 1 °C nuo tos temperatūros, kurioje yra atliekamas kalibravimas. Krioskopas neturi būti veikiamas saulės spindulių arba skersvėjų ir aukštesnės kaip 26-27°C kambario temperatūros.

Užtikrinama, kad krioskopas būtų gerame darbiname stovyje pagal gamintojo nurodymus ir būtų įjungtas mažiausiai 12 valandų prieš kalibravimą. Patikrinama zondo padėtis, maišymo vielos vibravimo amplitudė ir aušinančių skysčių temperatūrą.

Parengiami du etaloniniai tirpalai (žr. 1 lentelę viršuje), kurie būtų artimi tiriamų pieno mėginių numatomi užšalimo temperatūrai. Pageidautina, kad skirtumas tarp dviejų tirpalų užšalimo temperatūrų būtų ne mažesnis kaip – 0,100 °C.

Kai kurių šiuo metu naudojamų krioskopų konstrukcijoje termistoriaus grandinė yra sukonstruota tokiu būdu, kad ji yra išlyginama esant konkrečiai užšalimo temperatūros vertei prietaiso matavimo diapazone. Šiais atvejais etaloninio tirpalo su šia užšalimo temperatūra, kaip vieno iš kalibruojančių tirpalų, naudojimas palengvina kalibravimo procedūrą, ir gamintojas nurodo šią vertę.

Pipete įpilama $2,5 \pm 0,1$ ml vieno etaloninio tirpalo į švarų sausą mėgintuvėlį ir įjungiamas krioskopas.

Pastaba

Kalibravimui naudojami mėgintuvėliai turi būti pagaminti iš to paties tipo stiklo ir turi būti išplauti ir praskalauti demineralizuotu vandeniu tuo pat metu, kaip ir mėgintuvėliai, naudojami pieno mėginių tyrimui. Etaloninių tirpalų temperatūra turi būti analogiška pieno mėginių temperatūrai.

Kalibravimo valdymo rankenėlės reguliuojamos kaip nurodyta gamintojo, kol krioskopos parodymai taps lygūs etaloninio tirpalo užšalimo temperatūrai. Ši procedūra pakartojama su kitu etaloniniu tirpalu ir šiuo būdu toliau kaitaliojama, kol kiekvieno tirpalo vienas po kito einantys parodymai, nereguliuojant kalibravimo valdymo rankenėlių, pateiks kiekvieną teisingą užšalimo temperatūros vertę. Tada krioskopas bus parengtas naudojimui ir tiesiogiai be jokių koregavimų parodys pieno mėginio užšalimo temperatūrą.

7. Mėginio paruošimas

7.1. Jei būtina, mėginiai laikomi nuo 0 iki 5 °C temperatūroje.

7.2. Iš mėginio pašalinami visi matomi svetimkūniai arba kieti sviesto riebalų grūdėliai, jei būtina filtruojama į švarų sausą indą, ir mėginys atsargiai išmaišomas. Jeigu naudojamas filtras, jis turi nereaguoti su pienu ir būti efektyvus naudojant laboratorijos temperatūroje.

7.3. Tyrimai gali būti atliekami tada, kai pienas yra jo laikymo temperatūros (tarp 0° ir 5 °C) arba galima leisti jam pasiekti laboratorijos temperatūrą prieš pat pradedant tyrimą. Tačiau būtina, kad pieno mėginiai ir etaloninis tirpalas, kada jis yra naudojamas, būtų tos pačios temperatūros.

7.4. Titruojant nustatomas pieno rūgštingumas kiek galima tuo pačiu laiku, kada atliekamas užšalimo temperatūros nustatymas. Mėginiai su pieno rūgštingumu, didesniu kaip 0,18 g pieno rūgšties 100 ml pieno, negali būti tiriami.

7.5. Sterilizuotas ir ultraaukštoje temperatūroje apdorotas pienas prieš tyrimą mažiausiai 20 minučių turi būti palaikomas atvira inde.

8. Procedūra

8.1. Išankstinė kontrolė

Patikrinama, kad aušinančiojo skysčio temperatūra ir lygis atitiktų gamintojo nurodymus ir jeigu yra naudojamas termistoriaus zondas, patikrinama jo padėtis tuščiame mėgintuvėlyje. Įjungiamas krioskopas ir užtikrinama, kad aušinantis skystis būtų tinkamai maišomas ar atitinkamai cirkuliuojamas. Kada krioskopas jau buvo įjungtas mažiausiai 12 valandų, patikrinama aušinančiojo skysčio temperatūra, taip pat maišymo vielos padėtis ir vibravimo amplitudė.

8.2. Įprastinis kalibravimo patikrinimas

Prieš atliekant tyrimą, tikrinama natrio chlorido tirpalo užšalimo temperatūra (pvz. tirpalo, kurio užšalimo temperatūra $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$), kol du, vienas po kito einantys, parodymai nesiskirs daugiau nei $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jeigu šių verčių vidurkis skiriasi nuo etaloninio tirpalo užšalimo temperatūros daugiau nei $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$, iš naujo atliekamas krioskopo kalibravimas, kaip aprašyta 6 punkte.

Jeigu krioskopas yra pastoviai naudojamas, įprastinis kalibravimo patikrinimas atliekamas bent jau kas valandą. Būtina atsižvelgti į gamintojo nurodymus.

8.3. Pieno užšalimo temperatūros nustatymas

Atsargiai apverčiamas ir keletą kartų sukamas pieno mėginio butelis, kad susimaišytų jo turinys. Mėginys niekada neturi būti labai stipriai maišomas, kad jame neprisirinktų oro.

Pipete įpilama $2,5 \pm 0,1$ ml pieno į švarų, sausą mėgintuvėlį ir pipete pašalinamas jo perteklius. Užtikrinama, kad zondas ir maišymo viela būtų sausi ir švarūs, reikalui esant, atsargiai nuvaloma minkštu, švariu be plaušelių audiniu, traukiant iš apačios į viršų.

Mėgintuvėlis įstatomas pagal gamintojo nurodymus į kalibruotą krioskopą. Pienas bus atšaldytas ir užšaldymas prasidės esant gamintojo nurodytai temperatūrai $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ribose.

(Kai kuriuose automatinuose prietaisuose šią temperatūrą galima stebėti skaitmeniniais parodymais; mechaniniuose prietaisuose būtinas tikslumas yra pasiekiamas užtikrinant, kad užšalimas prasidėtų, kai galvometro rodyklė arba plona linija sutaps su atitinkamu paženklinimu).

Jeigu dėl kokios nors priežasties užšaldymas prasideda prieš arba po nurodyto temperatūros diapazono, tyrimas nutraukiamas ir pakartojamas su kita pieno mėginio porcija. Jeigu pakartotinas mėginys taip pat užšąla anksčiau už nurodytą temperatūrą, kita mėginio dalis pašildoma iki $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir laikoma 5 minutes, leidžiant ištirpti susikristalizavusiems riebalams.

Tada vėl atšaldoma iki tyrimo temperatūros ir iš karto atliekamas nustatymas. Pieno temperatūra prasidėjus šaldymui, greitai kils iki vertės, kuri faktiškai pasiliks pastovi tam tikrą laiką tarpą prieš pradėdant vėl kristi. Užšalimo temperatūra atitinka aukščiausią šio periodo metu pasiektą temperatūrą, ir ši vertė užregistruojama protokole.

Pastaba

Laikotarpis, kai temperatūra lieka pastovi, ir intervalas tarp šaldymo pradžios ir aukščiausios temperatūros pasiekimo skiriasi įvairiuose mėginiuose ir yra žymiai trumpesni vandeniui ir etaloniniams natrio chlorido tirpalams negu pienui. Labai svarbu, kad būtų užregistruota pati aukščiausia temperatūra.

Tyrimą patenkinamai užbaigus, mėgintuvėlis nuimamas, praskalaujamas vandeniu, po to išdžiovinamas termistoriaus zondas ir nuvalomas minkštu, švariu, be plaušelių audiniu, vedant iš apačios į viršų, ir analogiškai nustatomai kito pieno mėginio užšalimo temperatūrą.

Jeigu skirtumas tarp gautų užšalimo temperatūrų yra didesnis už pakartojamumo vertę ($0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$), pakartotinai analogiškai nustatoma b kito mėginio užšalimo temperatūra. Jeigu dvi nustatytos vertės sutampa $0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$ ribose, šios vertės užregistruojamos ir panaudojamos galutiniam rezultatui skaičiuoti.

8.4. Zondo aušinimas

Panaudojus prietaisą, įdedamas tuščias mėgintuvėlis į naudoto mėgintuvėlio vietą įdedamas tuščias mėgintuvėlis ir nuleidžiama darbinė galvutė, kad zondas būtų šaltas. (Kai kurių konstrukcijų krioskopuose to padaryti negalima; tais atvejais užtikrinama, kad zondas būtų reikiamai ataušintas prieš matuojant, pavyzdžiui, atliekant keletą kontrolinių tyrimų, kol yra gaunami nuoseklūs parodymai).

9. **Rezultatų išraiška**9.1. *Skaičiavimas*

Jeigu po įprastinio kalibravimo patikrinimo kalibravimas yra patvirtinamas, suskaičiuojamas pakartotinai gautų užšalimo temperatūros priimtinių verčių vidurkis, suapvalinant iki trečio dešimtainio skaitmens.

Jeigu dviejų priimtinių pakartotinių verčių suma yra nelyginis skaičius, vidurkis suapvalinamas iki artimiausios lyginės vertės, kaip parodyta pavyzdyje:

Užšalimo temperatūra, °C

Tyrimų dvejetainio rezultatai		Aritmetinis vidurkis
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

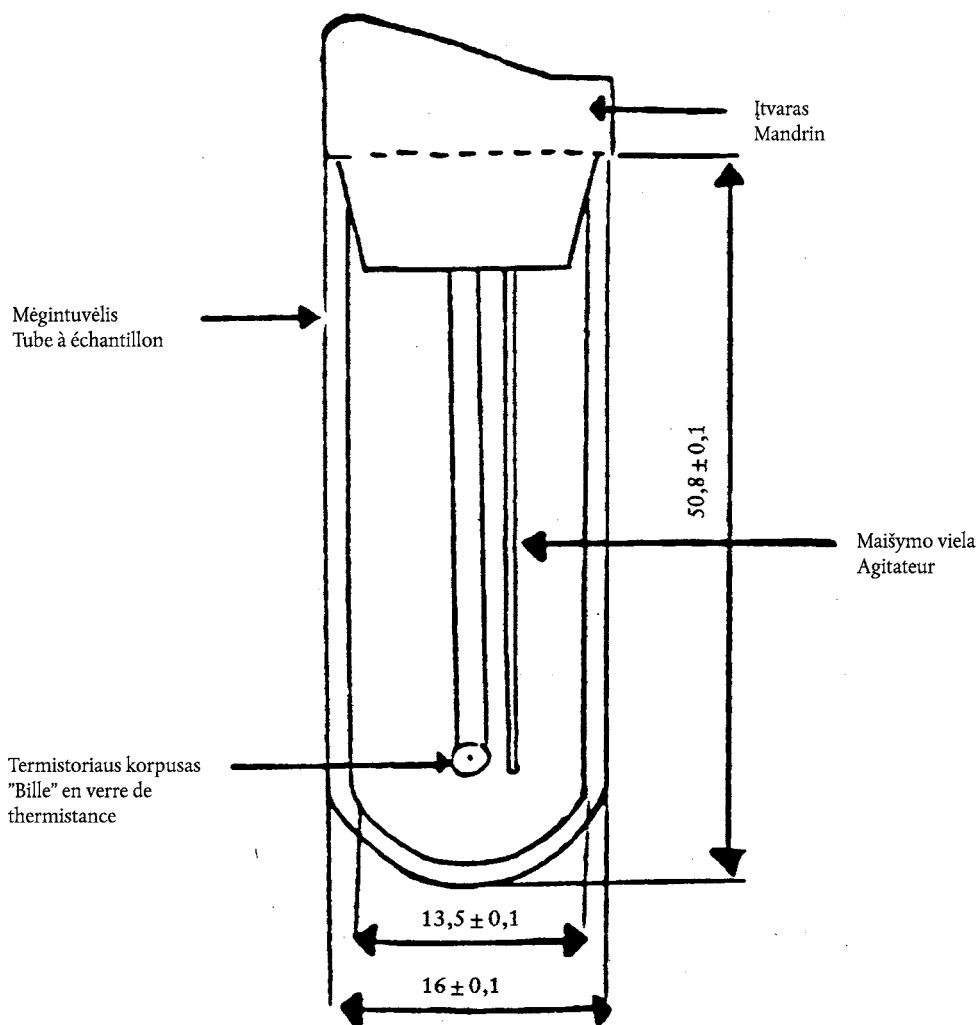
9.2. *Tikslumas:*

9.2.1. Duomenų pakartojamumas (r): 0,004 °C.

9.2.2. Duomenų atkuriamumas (R): 0,006 °C.

1 paveikslas.

Termistorinio krioskopų pjūvis (termistoriaus galvutės ir vielinės maišyklės padėtis mėgintuvėlyje)



Visi matmenys nurodyti mm
Toutes dimensions en mm

II. FOSFATAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS

1. Taikymo sritis

Ši procedūra yra fosfatazės aktyvumo pasteurizuotame piene nustatymo pamatinis metodas.

2. Apibrėžimas

2.1. Fosfatazės aktyvumas yra produkte esantis aktyvios šarminės fosfatazės kiekis, išreikštas fenolio kiekiu mikrogramais, metode aprašytais sąlygomis išskiriamas iš 1 ml pasteurizuoto pieno.

2.2. Bet koks pienas, kurio fosfatazės aktyvumas yra mažesnis už 4 µg/ml, yra laikomas fosfatazei neigiamu pienu.

3. Principas

Fosfatazės aktyvumas yra įvertinamas pagal fenolo kiekį, kuris išsiskiria, į mėginį pridėjus dinatrio fenilfosfato. Išskirtas fenolis reaguoja su dibromoksinochlorimidu, sudarydamas dibromindofenolą (melsvos spalvos), kuris yra matuojamas kolorimetriniu būdu esant bangos ilgiui 610 nm. Atliekamas suliginimas su mėginiu, kur fosfatazės fermentas buvo suardytas.

4. Reagentai

4.1. Bario borato — hidroksido buferinis tirpalas

4.1.1. Ištirpinama 50,0 g bario hidroksido ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) vandenyje ir praskiedžiamas iki 1 000 ml.

4.1.2. Ištirpinama 22,0 g boro rūgšties (H_3BO_3) vandenyje ir praskiedžiama iki 1 000 ml.

4.1.3. Pašildoma 500 ml kiekvieno tirpalo iki 50 °C, jie sumaišomi, greitai atšaldomi iki 20 °C, jeigu reikalinga, pakoreguojamas pH iki $10,6 \pm 0,1$ pridedant 4.1.1 arba 4.1.2. punktuose nurodyto tirpalo. Nufiltruojama. Tirpalas laikomas sandariai užkimštame inde.

4.1.4. Prieš panaudojant tirpalas atskiedžiamas vienodu vandens tūriu.

4.2. Nuspalvinimo buferinis tirpalas

6,0 g natrio metaborato (NaBO_2) arba 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ir 20 g natrio chlorido (NaCl) ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 000 ml.

4.3. Spalvos skiedinio buferinis tirpalas

10 ml nuspalvinimo buferinio tirpalo (4.2) praskiedžiama vandeniu iki 100 ml.

4.4. Buferis substrato tirpalas

0,1 g bevandenio, neturinio fenolo, dinatriofenilfosfato ištirpinama 100 ml buferinio tirpalo (4.1.3) arba 0,5 g dinatrio fenilfosfato ištirpinama 4,5 ml nuspalvinimo buferiniame tirpale (4.2), įlašinami du lašai BQC tirpalo (4.6) ir paliekama 30 minučių kambario temperatūroje. Susidariusi spalva ekstrahuojama, naudojant 2,5 ml 1–butanolio ir paliekama stovėti, kol 1–butanolis atsiskirs. 1–butanolis nupilamas. Esant reikalui, ši ekstrakcija pakartojama.

Tirpalas gali būti laikomas šaldytuve keletą dienų; prieš vartojimą spalva išryškinama ir iš naujo ekstrahuojama. Buferinio substrato tirpalas paruošiamas prieš pat vartojimą, praskiedžiant šio tirpalo 1 ml iki 100 ml bario borato hidroksido buferiniu tirpalu (4.1.3).

4.5. Cinko ir vario nusodiklis

3,0 g cinko sulfato ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ir 0,6 g vario (II) sulfato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 100 ml.

4.6. 2,6 – dibromoksinonchlorimido tirpalas (BQC tirpalas)

40 ± 1 mg 2,6 – dibromoksinonchlorimido ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) ištirpinama 10 ml 96 % (pagal tūrį) etilo spirito.

Laikoma tamsios spalvos butelyje šaldytuve. Jei jis praranda spalvą arba yra laikomas ilgiau kaip vieną mėnesį, išmetamas.

4.7. *Vario (II) sulfato tirpalas*

0,05 g vario (II) sulfato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 100 ml.

4.8. *Fenolio etaloniniai tirpalai*

4.8.1. Pasveriam 200 ± 2 mg gryno bevandenio fenolio, jis supilamas į 100 ml matavimo kolbą, praskiedžiama vandeniu iki žymės ir sumaišoma. Šis pagrindinis tirpalas keletą mėnesių laikomas šaldytuve lieka stabilus.

4.8.2. 10 ml šio pagrindinio tirpalo atskiedžiama vandeniu iki 100 ml ir sumaišoma. 1 ml yra 200 µg fenolio.

5. **Prietaisai ir stikliniai indai**

Pastabos:

- a) Visi stikliniai indai, kamščiai ir mėginių ėmimo priemonės turi būti kruopščiai išvalomi. Rekomenduojama praskalauti juos šviežiai užvirintu distiliuotu vandeniu arba palaikyti garuose.
- b) Kai kurie plastikinių kamščių tipai gali sukelti užteršimą fenoliu ir todėl jų negalima leisti vartoti.

Įprasta laboratorinė įranga:

5.1. *Analizinės svarstyklės*

5.2. *Vandens vonia*, palaikanti 37 ± 1 °C temperatūrą.

5.3. *Spektrofotometras*, tinkantis matuoti esant 610 nm bangos ilgiui.

5.4. *Mėgintuvėliai* 16 arba 18 mm × 150 mm pageidautinai su 5 arba 10 ml padalomis.

5.5. *Pipetės*

5.6. Tinkamo dydžio, pvz., 5 cm skersmens *stikliniai piltuvėliai*.

5.7. Mažiausiai 9 cm skersmens *daugiasluoksniai filtrai*, skirti filtruoti vidutiniu greičiu.

5.8. *Matavimo kolbos* etaloniniams tirpalams paruošti.

6. **Procedūra**

Pastabos:

- a) Rezultato nustatymo metu vengiama tiesioginių saulės spindulių.
- b) Užteršimas seilių ar prakaito pėdsakais gali duoti neteisingus teigiamus rezultatus, todėl turi būti vengtinas. Šiuo atžvilgiu ypatingas dėmesys skiriamas darbui su pipete.

6.1. *Mėginio paruošimas*

6.1.1. Analizė atliekama iš karto po mėginio paėmimo. Priešingu atveju mėginiai laikomi šaldytuve, bet ne ilgiau kaip dvi dienas.

6.2. *Mėginys*

Į kiekvieną iš dviejų mėgintuvėlių (5.4) pipete įpilama po 1 ml mėginio, naudojant vieną mėgintuvėlį kaip kontrolinį.

6.3. *Rezultato nustatymas*

6.3.1. Kontrolinis mėgintuvėlis pakaitinamas dvi minutes verdančiame vandenyje; bandymo mėgintuvėlis ir laboratorinė verdančio vandens stiklinė apdengiami aliumine folija siekiant užtikrinti, kad bus kaitinamas visas mėgintuvėlis. Greitai atšaldoma iki kambario temperatūros.

6.3.2. Likusią procedūros dalį su kontroliniu mėginiu elgiamasi vienodai. Pripilama 10 ml buferinio substrato (4.4) ir sumaišoma.

- 6.3.3. Iš karto mėgintuvėliai įstatomi į vandens vonią (5.2) 60 minučių, kartais pamašant (mažiausiai 4 kartus).
- 6.3.4. Kaitinama verdančiame vandenyje 2 minutes, kaip nurodyta 6.3.1 punkte. Greitai atšaldoma iki kambario temperatūros.
- 6.3.5. Įpilama po 1 ml cinko ir vario nusodiklio (4.5) į kiekvieną mėgintuvėlį ir kruopščiai išmaišoma.
- 6.3.6. Nufiltruojama naudojant sausą filtrinį popierių, išpilami pirmieji 2 ml, pakartotinai nufiltruojama, jeigu būtina, kol filtratas bus visiškai skaidrus, ir surinkama į mėgintuvėlį 5 ml filtrato.
- 6.3.7. Įpilama 5 ml nuspalvinimo buferinio tirpalo (4.2).
- 6.3.8. Įpilama 0,1 ml BQC tirpalo (4.6), sumaišoma ir leidžiama per 30 minučių kambario temperatūroje išryškėti spalvai.
- 6.3.9. Spektrofotometru pamatuojama absorbcija, lyginant su kontroliniu, esant 610 nm bangos ilgiui.
- 6.3.10. Jeigu pagal 6.3.9 punktą pamatuota absorbcija viršija etaloninio tirpalo, kuriame yra 20 µg fenolio, absorbciją, pamatuotą pagal 6.4.4 punktą, analizė pakartojama atitinkamai atskiedus mėginį. Skiedžiama sumaišant vieną mėginio tūrio dalį su atitinkamu to paties mėginio tūriu, atsargiai pakaitintu iki virimo, kad būtų inaktyvuojama fosfatazė.
- 6.4. *Kalibravimo kreivės paruošimas*
- 6.4.1. Parengiamas tinkamas etaloninio fenolio tirpalas (4.8.2), turintis 0 (kontroliniame), 2, 5, 10 ir 20 µg fenolio 1 mililitre ir pipete atitinkamai prilašinama po 1 ml vandens ir po 1 ml keturių etaloninių fenolio tirpalų į kiekvieną iš penkių mėgintuvėlių.
- 6.4.2. Į kiekvieną mėgintuvėlį pripilama po 1 ml vario (II) sulfato tirpalo (4.7), 5 ml praskiesto spalvos išryškavimo buferinio tirpalo (4.3), 3 ml vandens ir 0,1 ml BQC tirpalo (4.6), sumaišoma.
- 6.4.3. Leidžiama spalvai išryškėti per 30 minučių, esant kambario temperatūrai.
- 6.4.4. Absorbcija išmatuojama spektrofotometru, esant 610 nm bangos ilgiui (5.3), lyginant su kontroliniu mėginiu.
- 6.4.5. Iš absorbcijos verčių (6.4.4), gautų pagal pridėto fenolio kiekį (6.4.1), naudojant mažiausių kvadratų metodą, apskaičiuojama regresijos tiesė.
7. **Rezultatų išraiška**
- 7.1. *Skaičiavimas ir formulė*
- 7.1.1. Naudojant gautą regresijos tiesę (6.4.5), iš absorbcijos verčių (6.3.9) paskaičiuojamas fenolio kiekis.
- 7.1.2. Paskaičiuojamas fosfatazės aktyvumas, išreikštas fenolio mikrogramais viename pasterizuoto pieno mililitre, pagal formulę:
- $$\text{Fosfatazės aktyvumas} = 2,4 \times A \times D$$
- kur:
- A — fenolio kiekis mikrogramais, gautas pagal 7.1.1 punktą
- D — skiedimo koeficientas pagal 6.3.10 punktą (jei nebuvo skiedžiama, D = 1)
- 2,4 yra skiedimo koeficientas (5/12 viename ml mėginio). Žr. 6.2. punktą kartu su 6.3.2, 6.3.5 ir 6.3.6 punktais.
- 7.2. *Tikslumas*
- 7.2.1. Rezultatų pakartojamumas (r) — 2 µg fenolio/ml.
- 7.2.2. Rezultatų atkuriamumas (R): 3 (preliminariai) µg fenolio/ml.
- 7.2.3. Jeigu skiedimas yra taikomas pagal 6.3.10, 7.2.1 ir 7.2.2 punktuose paminėtas ribas, tikslumas taikomas praskiesto mėginio rezultatams.

III. PEROKSIDAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS**1. Taikymo sritis**

Ši procedūra yra pamatinis metodas peroksidazės fermento piene, atliekant pasterizavimo kontrolę, nustatymui.

2. Apibrėžimas

Peroksidazės teigiama reakcija:

Jeigu pienas yra tinkamai pasterizuotas, per 30 sekundžių po sumaišymo su reagentais nusidažo mėlyna spalva.

Peroksidazės neigiama reakcija:

Praėjus 30 sekundžių po sumaišymo su reagentais, spalva nepasikeičia.

3. Principas

Peroksidazės fermentas ardo vandenilio peroksidą. Išskirtas atominis vandenilis oksiduoja bespalvį 1,4 — fenilendiaminą į purpurinį indofenolą (Storch bandymas). Spalvos intensyvumas yra proporcingas fermento koncentracijai.

4. Reagentai**4.1. 1,4 — fenilendiamino tirpalas**

2 g 1,4 fenilendiamino ($C_6H_8N_2$) ištirpinama šiltame (50 °C) vandenyje ir praskiedžiama iki 100 ml. Tirpalas laikomas tamsiame rudo stiklo butelyje su stikliniu kamščiu, vėsioje ir tamsioje vietoje. Jei per 1–2 dienas po paruošimo 1,4 – fenilendiamino tirpalas išskiria nuosėdas, jis išpilamas.

4.2. Vandenilio peroksido tirpalas

9 ml 30 % vandenilio peroksido atskiedžiama vandeniu iki 100 ml. Stabilizavimui 1 ml koncentruotos sieros rūgšties pripilama į 1 l tirpalo.

Vandenilio peroksido tirpalas yra stabilus vieną mėnesį, jeigu jis yra laikomas vėsioje tamsioje vietoje butelyje su stikliniu kamščiu, apsaugant nuo bet kokio sąlyčio su organiniais junginiais.

5. Procedūra

5.1 5 ml pieno mėginio įpilama į švarų mėgintuvėlį su tinkamu kamščiu.

5.2 Pripilama 5 ml 1,4-fenilendiamino tirpalo (4.1).

5.3 Įlašinami 2 lašai vandenilio peroksido tirpalo (4.2).

5.4 Spalvos susidarymas stebimas 30 sekundžių po sumaišymo. Jeigu mėlyna spalva atsiranda vėliau, praėjus 30 sekundžių po sumaišymo, reakcija yra nespecifinė.

IV. MIKROORGANIZMŲ SKAIČIAUS NUSTATYMAS PAGAL SKAIČIUOJAMAS KOLONIJAS LĖ KŠTELĖJE 30 °C TEMPERATŪROJE

1. Taikymo sritis

Ši procedūra yra pamatinis metodas mikroorganizmų skaičiaus, naudojant kolonijų suskaičiavimo metodą 30 °C temperatūroje, nustatymui. Metodas yra taikomas žaliame, pasterizuotam pienui, taip pat sterilizuotam ir ultraaukštoje temperatūroje apdorotam pienui, prieš tai 15 dienų išlaikytam 30 °C temperatūroje.

2. Apibrėžimas

„Mikroorganizmai“ reiškia organizmus, formuojančius suskaičiuojamas kolonijas, kai jie laikomi aprašytomis aerobinėmis sąlygomis.

3. Principas

Tam tikras pieno mėginio tūris yra sumaišomas Petri lėkštelėse su mitybine terpe ir laikomas 72 valandas 30 °C temperatūroje. Kolonijos yra suskaičiuojamos ir paskaičiuojamas mikroorganizmų skaičius, esantis 1 ml žalio ar pasterizuoto pieno arba 0,1 ml sterilizuoto ar ultraaukštoje temperatūroje apdoroto pieno su pradiniu išlaikymu.

4. Prietaisai ir stikliniai indai

Paprastai naudojama laboratorinė įranga:

4.1. Prietaisai

- 4.1.1. Sterilizavimo krosnis, kurioje palaikoma (170–175) °C temperatūra.
- 4.1.2. Autoklavas, kuriame palaikoma 121 ± 1 °C temperatūra.
- 4.1.3. Termostatas, galintis palaikyti visoje erdvėje 30 ± 1 °C temperatūrą.
- 4.1.4. PH-metras su temperatūros reguliatoriumi, veikiantis $\pm 0,1$ pH vieneto tikslumu.
- 4.1.5. Vandens vonia, palaikanti 45 ± 1 °C temperatūrą.
- 4.1.6. Lupa, galinti padidinti 2–4 kartus.
- 4.1.7. Lupa, galinti padidinti 8–10 kartus.
- 4.1.8. Skaitiklis.
- 4.1.9. Maišytuvas, galintis sumaišyti 1 ml pieno mėginio arba atlikti dešimtkartį atskiedimą su 9 ml skiediklio ir dirbantis ekscentrinio rotaciniu tiriamųjų mėgintuvėlių skysčių judesiu.

4.2. Stikliniai indai

- 4.2.1. Tinkamai uždaromi pakankamos talpos mėgintuvėliai, turintys viršuje pakankamai erdvės sumaišyti 10 ml pirminio skiedinio ar tolimesnius dešimtkarčius skiedinius.
- 4.2.2. Nuo 150 iki 250 ml talpos kolbos arba apie 20 ml talpos mėgintuvėliai mitybinei terpei laikyti.
- 4.2.3. Pipetės (su vatos kamščiais), pagamintos iš stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos su nenudaužtu galu, 1 ml talpos žyme, kurių išteklėjimo angos skersmuo nuo 1,75 iki 3 mm.
- 4.2.4. Petri lėkštelės, pagamintos iš skaidraus nespaltoto stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos, kurių indo dugnas turi apie 90 – 100 mm vidinį skersmenį. Vidaus gylis turi būti ne mažiau kaip 10 mm. Dugnas turi būti be nelygumų, trukdančių skaičiuoti kolonijas.
- 4.2.5. Stiklinių indų sterilizavimas.
Stikliniai indai turi būti sterilizuojami, naudojant vieną iš šių procedūrų:
 - a) laikant juos ne trumpiau kaip vieną valandą sterilizavimo krosnyje, temperatūroje nuo 170° iki 175 °C (4.1.1);
 - b) laikant juos ne trumpiau kaip 20 minučių autoklave, 121 ± 1 °C temperatūroje (4.1.2).

Autoklave būtina užtikrinamas pakankamas garų prasiskverbimas — t. y., jeigu įranga yra sterilizuojama induose, jie neturi būti akliai uždaryti, kolbų kamščiai turi būti atlaisvinti.

Autoklave sterilizuoti stikliniai indai išdžiovinami išleidus garą.

Pipetės sterilizuojamos sterilizavimo krosnyje (4.1.1).

5. **Pieno agaro mitybinė terpė.**

5.1 *Sudėtis:*

Mielų ekstrakto	2,5 g
Triptono	5,0 g
Gliukozės D (+) arba dekstrozės	1,0 g
Nugriebto pieno miltelių	1,0 g
Agaro	nuo 10 iki 15 g, priklausomai nuo naudojamo agaro sudaromo gelio tvirtumo
Vandens	1 000 ml

Nugriebto pieno milteliai turi būti be inhibitorinių medžiagų. Tai tikrinama naudojant lyginamuosius tyrimus su nugriebto pieno milteliais, kurie neturi inhibitorinių medžiagų.

Paruošimas:

Sudėtinės dalys pasveriamos ir ištirpinamos vandenyje šia tvarka: mielių ekstraktas, triptonas, gliukozė ir galiausiai nugriebto pieno milteliai. Kaitinimas pagreitina suspensijos tirpimą. Pridedama agaro ir kaitinama iki virimo, kol agaras pilnai ištirpsta, arba tirpinama garuose apie 30 minučių.

Jeigu būtina, filtruojama per filtrinį popierių.

Patikrinamas pH su pH – metru (4.1.4) ir, jeigu būtina, naudojant natrio hidroksido ar druskos rūgšties tirpalą (mažiausiai 0,1 mol/l koncentracijos), pakoreguojamas pH tokiu būdu, kad po sterilizacijos jis būtų $6,9 \pm 0,1$, matuojant $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

5.2. *Mitybinės terpės išpilstymas, sterilizacija ir laikymas.*

Terpė (5.1) išpilstoma į kolbas po 100–150 ml arba į mėgintuvėlius (4.2.2) po 12–15 ml. Kolbos ir mėgintuvėliai užkemšami.

Sterilizuojama 15 minučių autoklave (4.1.2) $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Patikrinama terpės pH.

Jeigu terpė iš karto nenaudojama, laikoma tamsoje nuo 1 iki 5 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ne ilgiau kaip vieną mėnesį po paruošimo.

5.3. *Komercinė sausoji mitybinė terpė.*

Mitybinė terpė (5.1) paruošiama iš komercinės sausosios terpės. Laikomasi gamintojo nurodymų, bet prieš ištirpinant pridedama nugriebto pieno miltelių, jeigu jų nėra tarp sudėtinųjų dalių.

Pakoreguojamas pH iki $6,9 \pm 0,1$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kaip aprašyta 5.1 punkte, ir išpilstoma; terpė sterilizuojama ir laikoma, kaip nurodyta 5.2 punkte.

6. **Skiedikliai**

6.1. *Peptono fiziologinis tirpalas*

Sudėtis	
Peptono	1,0 g
Natrio chlorido (Na Cl)	8,5 g
Vandens	1 000 ml.

Paruošimas:

Sudedamosios dalys ištirpinamos vandenyje, jeigu būtina, pakaitinama.

Patikrinamas pH su pH-metru (4.1.4) ir, jeigu būtina, naudojant natrio hidroksido ar druskos rūgšties tirpalą (mažiausiai 0,1 mol/l koncentracijos), pH pakoreguojamas tokiu būdu, kad po sterilizacijos jis būtų $7,0 \pm 0,1$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

- 6.2. *Skiediklio išpilstymas, sterilizavimas ir laikymas*
- Skiediklis (6.1) išpilstomas į mėgintuvėlius (4.2.1) tokiais kiekiais, kad po sterilizacijos kiekviename mėgintuvėlyje būtų $9,0 \pm 0,2$ ml skiediklio. Mėgintuvėliai užkemšami.
- Sterilizuojama autoklave (4.1.2) 121 ± 1 °C temperatūroje 15 minučių.
- Patikrinama skiediklio pH.
- Jeigu skiediklis iš karto nenaudojamas, laikomas tamsoje, nuo 1° iki 5 °C temperatūroje, ne ilgiau kaip vieną mėnesį po paruošimo.
- 6.3. *Komerciniai sausieji skiedikliai*
- Skiediklis (6.1) gali būti paruoštas iš komercinių sausųjų tablečių ar miltelių. Ruošiama pagal gamintojo nurodymus. Pakoreguojama, kaip aprašyta 6.1 punkte, ir ištirpinama, tirpikliai sterilizuojami ir laikomi kaip nurodyta 6.2 punkte.
7. **Procedūra**
- 7.1. *Terpės ištirpinimas*
- Prieš pradedant mikrobiologinį tyrimą, greitai ištirpinamas reikiamas terpės kiekis ir terpė kaitinama iki 45 ± 1 °C vandens vonioje (4.1.5).
- 7.2. *Pieno mėginio paruošimas*
- Pieno mėginys kruopščiai išmaišomas, greitai vartant indą su pieno mėginiu 25 kartus, tokiu būdu kad mikroorganizmai pasiskirstytų kiek galima tolygiau. Vengiama putojimo arba leidžiama putoms pasiskirstyti. Laikotarpis tarp sumaišymo ir pieno mėginio paėmimo neturi viršyti trijų minučių.
- 7.3. *Pirmojo skiedinio paruošimas (10^{-1}) (žaliam ir pasterizuotam pienui).*
- 1 ml žalio ar pasterizuoto pieno mėginio (4.2.3) sterilia pipete (4.2.3) įpilama į 9 ml skiediklio (6.1), vengiant pipetės ir skiediklio sąlyčio. Skiediklio temperatūra turi būti apytikriai tokia pati, kaip ir pieno mėginio. Šis pirminis skiedinys atsargiai maišomas 5–10 sekundžių maišytuve.
- Tokiu būdu yra gaunamas pirminis skiedinys 10^{-1} .
- 7.4. *Tolimesnių dešimtkarčių skiedinių (žaliam ir pasterizuotam pienui) paruošimas.*
- 1 ml pirmojo skiedinio (7.3) įpilama sterilia pipete (4.2.3) į 9 ml skiediklio (6.1) pagal 7.3 punkte pateiktas instrukcijas.
- Tokiu būdu gaunamas 10^{-2} skiedinys.
- Šie veiksmai pakartojami siekiant gauti tolimesnius dešimtkarčius skiedinius, kol gaunamas atitinkamas mikroorganizmų skaičius (8.1.1).
- 7.5. *Sėjimas į Petri lėkšteles.*
- 7.5.1. Žalias pienas. Į Petri lėkštelę (4.2.4) sterilia pipete (4.2.3) įpilama 1 ml mėginio ir (arba) atitinkamas dešimtkartis skiedinys. Turi būti ištirti mažiausiai du skiediniai. Paruošiamas vienas indelis iš kiekvieno pasirinkto tinkamo skiedinio (8.1.1).
- 7.5.2. Pasterizuotas pienas: įpilama sterilia pipete (4.2.3) 1 ml mėginio ir (arba) atitinkamo dešimtkarčio skiedinio į lėkštelę (4.2.4). Turi būti ištirti mažiausiai du skiediniai. Kiekvienam pasirinktam skiediniui (8.1.1) paruošiama po dvi Petri lėkšteles.
- 7.5.3. Sterilizuotas ir ultra aukštoje temperatūroje apdorotas pienas (tiriamas po 15 dienų išlaikymo 30 °C temperatūroje — Direktyvos A priedas, VII skyrius, 5 punktas):
- Į Petri lėkštelę (4.2.4) sterilia pipete (4.2.3) įpilama 0,1 ml pieno mėginio (7.2). Paruošiamos dvi lėkšteles.

7.6. *Terpės supylimas*

Į kiekvieną sėjamą lėkštelę įpilama apytikriai nuo 15 iki 18 ml terpės (7.1).

Iš karto po išpilstymo maišoma Petri lėkštelė pakankamai sukant, kad kolonijos po išlaikymo tolygiai išsiskaidytų.

Laikotarpis tarp pieno mėginio paruošimo ir sumaišymo su terpe, priklausomai nuo pieno, mėginio ar skiedinio rūšies, neturi būti ilgesnis kaip 15 minučių.

Leidžiama sustingti ant švaraus, vėsaus, horizontalaus paviršiaus.

7.7. *Petri lėkštelių inkubavimas*

Lėkštelės sudedamos į termostatą (4.1.3). Lėkštelės laikomos apverstos. Jos sudedamos viena ant kitos, ne daugiau kaip šešios. Sudėtų lėkštelių krūvos turi būti atskirtos viena nuo kitos, taip pat ir nuo termostato sienelių ir viršaus.

Inkubuojama 72 ± 2 valandas 30 ± 1 °C temperatūroje.

7.8. *Kolonijų skaičiavimas*

Kolonijos skaičiuojamos Petri lėkštelėse, turinčiose ne daugiau kaip 300 kolonijų.

Lėkštelės apžiūrimos neryškioje šviesoje. Kad palengvintų skaičiavimą, gali būti naudojamos tinkamos lupos (4.1.6) ir (arba) skaitiklis (4.1.8). Skaičiuojant labai mažas kolonijas, vengiama klaidinančių medžiagos nuosėdų dalelių. Naudojant didesnio padidrinimo lupas (4.1.7), atsargiai ištiriami abejotini objektai, siekiant atskirti kolonijas nuo pašalinių medžiagų.

Išsiplėtusios kolonijos yra laikomos atskiromis kolonijomis. Jeigu išsiplėtusių kolonijų yra priaugę mažiau nei vienas ketvirtadalis, suskaičiuojamos būtinai kolonijos likusioje lėkštelės dalyje ir paskaičiuojamas atitinkamas visos lėkštelės mikroorganizmų skaičius. Jeigu daugiau nei vienas ketvirtadalis lėkštelės yra priaugęs išsiplėtusių kolonijų, lėkštelė išmetama.

8. **Rezultatų apskaičiavimas ir išraiška**8.1. *Žalias ir pasterizuotas pienas*

8.1.1. Panaudoti visų lėkštelių, turinčių nuo 10 iki 300 kolonijų, suskaičiuotą rezultatą. (žr. 8.1.3 ir 8.1.4)

8.1.2. Mikroorganizmų, esančių 1 ml žalio pasterizuoto pieno, skaičius yra išreiškiamas pagal formulę:

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

čia:

$\sum C$ – suma kolonijų, suskaičiuotų kaip nurodyta 8.1.1,

$(n_1 + 0,1n_2) d$ – atitinka mėginio, įpilto į lėkštelę, tūrį, kur:

n_1 – pirmojo skiedinio lėkštelių skaičius,

n_2 – antrojo skiedinio lėkštelių skaičius,

d – skiedimo koeficientas, atitinkantis pirmąjį skiedinį, kurio lėkštelės buvo atrinktos kolonijų skaičiavimui.

Skaičiavimo rezultatas suapvalinamas iki dviejų reikšminių skaičių. Kai apvalinamas skaičius yra 5, suapvalinama į kairę taip, kad būtų gautas lyginis skaičius.

Pavyzdys (pasterizuotas pienas):

Skiedinio 10^{-2} rezultatai 278 ir 290 kolonijų

Skiedinio 10^{-3} rezultatai 33 ir 28 kolonijos

$$\begin{aligned} \text{Liczba/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28590 \\ &= 29000 \\ &= 2,9 \times 10^4 \end{aligned}$$

- 8.1.3. Jeigu yra tik lėkštelės, kuriose išaugo mažiau nei 10 kolonijų, mikroorganizmų skaičius 1 mililitre išreiškiamas kaip „mažesnis už $10 \times d$ viename ml“; d — žemiausio skiedinio laipsnį atitinkantis atvirkštinis dydis.
- 8.1.4. Jeigu yra tik lėkštelės, kuriose išaugo daugiau kaip 300 kolonijų, bet įmanoma suskaičiuoti, tuomet kolonijų skaičių padauginti iš skiedimo laipsnį atitinkančio atvirkštinio dydžio. Rezultatas užrašomas kaip „paskaičiuotas mikroorganizmų skaičius viename ml.“
- 8.2. *Sterilizuotas ir ultraaukštoje temperatūroje apdorotas pienas*
Jeigu 0,1 ml yra daugiau nei 10 kolonijas sudarančių vienetų, šie skaičiai turi būti laikomi nebeatitinkančiais Direktyvos 85/397/EEB reikalavimų.
9. **Tikslumas**
Tarptautiniu būdu pripažintų tarplaboratorinių tyrimų rezultatų dar nėra.

V. **MIKROORGANIZMŲ SKAIČIAUS NUSTATYMAS PAGAL SKAIČIUOJAMAS KOLONIJAS 21 °C TEMPERATŪROJE**

1. **Taikymo sritis**

Ši procedūra yra mikroorganizmų, esančių pasterizuotame piene, po jo 5 dienų išlaikymo 6 °C temperatūroje, skaičiaus nustatymo pamatinis metodas, atliekamas naudojant kolonijų suskaičiavimo metodą 21 °C temperatūroje, siekiant nustatyti pasterizuoto pieno užterštumą psichotropiniais mikroorganizmais, galinčiais dauginis piene 6 °C temperatūroje.

2. **Apibrėžimas**

„Mikroorganizmai“ reiškia organizmus, sudarančius suskaičiuojamas kolonijas, laikant aerobinėmis nurodytomis sąlygomis.

3. **Principas**

Pasterizuotas pienas išlaikomas 5 dienas 6 °C temperatūroje. Tam tikras pieno mėginio kiekis sumaišomas Petri lėkštelėse su mitybine terpe ir inkubuojamas 25 valandas 21 °C temperatūroje. Kolonijos yra suskaičiuojamos, taip pat paskaičiuojamas mikroorganizmų skaičius, esantis 1 ml pasterizuoto pieno.

4. **Prietaisai ir stikliniai indai**

Įprasta laboratorinė įranga

4.1. *Prietaisai*

4.1.1. Sterilizavimo krosnis, kurioje palaikoma 170–175 °C temperatūra.

4.1.2. Autoklavas, kuriame palaikoma 121 ± 1 °C temperatūra.

4.1.3. Termostatai, galintys palaikyti visoje erdvėje temperatūrą:

a) $6 \pm 0,2$ °C

b) 21 ± 1 °C

4.1.4. PH-metras su temperatūros reguliatoriumi, dirbantis $\pm 0,1$ pH vieneto tikslumu.

4.1.5. Vandens vonia, palaikanti 45 ± 1 °C temperatūrą.

4.1.6. Lupa, galinti padidinti 2–4 kartus.

4.1.7. Lupa, galinti padidinti 8–10 kartus.

4.1.8. Skaitiklis

4.1.9. Maišytuvas, galintis sumaišyti 1 ml pieno mėginio arba atlikti dešimtkartį atskiedimą su 9 ml skiediklio ir dirbantis ekscentrinio rotacinio tiriamųjų mėgintuvėlių skysčių judesiu.

4.2. *Stikliniai indai*

4.2.1. Tinkamai uždaryti ir pakankamos talpos mėgintuvėliai, turintys viršuje pakankamai erdvės sumaišyti 10 ml pirmojo skiedinio ar tolimesnius dešimtkarčius skiedinius.

4.2.2. Nuo 150 iki 250 ml talpos kolbos arba apie 20 ml talpos mėgintuvėliai mitybinei terpei laikyti.

4.2.3. Pipetės (su vatos kamščiais) pagamintos iš stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos su nenu daužtu galu ir 1 ml talpos žyme, kurių ište kėjimo angos skersmuo nuo 1,75 iki 3 mm.

4.2.4. Petri lėkštelės, pagamintos iš skaidraus nesp alvoto stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos, kurių indo dugnas turi apie (90-100) mm vidinį skersmenį. Vidaus gylis turi būti ne mažesnis kaip 10 mm. Dugnas turi būti be nelygumų, trukdančių skaičiuoti kolonijas.

4.2.5. Stiklinių indų sterilizavimas

Stikliniai indai sterilizuojami, naudojant vieną iš šių procedūrų:

a) laikant juos ne trumpiau kaip vieną valandą sterilizavimo krosnyje 170–175 °C temperatūroje (4.1.1);

b) laikant juos ne trumpiau kaip 20 minučių autoklave 121 ± 1 °C temperatūroje (4.1.2).

Būtina autoklave užtikrinti pakankamą garų prasiskverbimą — t. y. jeigu įranga yra sterilizuojama induose, jie neturi būti aklinau uždaryti, kolbos turi būti su atlaisvintais kamščiais.

Autoklave sterilizuoti stikliniai indai turi būti išdžiovinti išleidus garą.

Pipetės turi būti sterilizuotos sterilizavimo krosnyje (4.1.1).

5. **Pieno agaro mitybinė terpė kolonijoms skaičiuoti.**

5.1. *Sudėtis:*

Mielių ekstrakto	2,5 g
Triptono	5,0 g
Gliukozės D(+) arba dekstrozės	1,0 g
Nugriebto pieno miltelių	1,0 g
Agaro	nuo 10 iki 15 g, priklausomai nuo naudojamo agaro sudarančių gelių savybių
Vandens	1 000 ml.

Nugriebto pieno milteliai turi būti be inhibitorinių medžiagų. Tai turi būti patikrinta naudojant sulyginamuosius tyrimus su nugriebto pieno milteliais, kuriuose nėra inhibitorinių medžiagų.

Paruošimas:

Sudėtinės dalys atsveriamos ir ištirpinamos vandenyje šia tvarka: mielių ekstraktas, triptonas, gliukozė ir galiausiai nugriebto pieno milteliai. Suspensijos kaitinimas pagreitins tirpinimą. Pridedama agaro ir kaitinama iki virimo, kol agaras pilnai ištirps, arba apie 30 minučių tirpinama garuose.

Jeigu būtina, filtruojama per filtrinį popierių.

Patikrinama pH su pH-metru (4.1.4) ir, jei būtina, naudojant natrio hidroksido ar druskos rūgšties tirpalą (mažiausiai 0,1 mol/l koncentracijos), pH pakoreguojamas tokiu būdu, kad po sterilizacijos jis būtų $6,9 \pm 0,1$ 25 °C temperatūroje.

5.2. *Mitybinės terpės išpilstymas, sterilizacija ir laikymas.*

Terpė (5.1) išpilstoma į kolbas po 100–150 ml arba į mėgintuvėlius (4.2.2). po 12–15 ml. Kolbos ir mėgintuvėliai užkemšami.

Sterilizuojama autoklave (4.1.2) 121 ± 1 °C temperatūroje 15 minučių.

Patikrinama terpės pH.

Jeigu terpė iš karto nenaudojama, laikoma tamsoje, nuo 1 iki 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip vieną mėnesį po paruošimo.

5.3. *Komercinė sausoji mitybinė terpė.*

Mitybinė terpė (5.1) gali būti paruošta iš komercinės sausosios terpės. Laikoma gamintojo nurodymų, bet prieš ištirpinant pridėti nugriebto pieno miltelių, jeigu jų nėra tarp sudėtinių dalių.

Pakoreguojamas pH iki $6,9 \pm 0,1$ 25 °C temperatūroje, kaip aprašyta 5.1 punkte ir ištirpinama; terpė sterilizuojama ir laikoma, kaip nurodyta 5.2 punkte.

6. **Skiedikliai**

6.1. *Peptono fiziologinis tirpalas*

Sudėtis:

Peptono	1,0 g
Natrio chlorido (Na Cl)	8,5 g
Vandens	1 000 ml

Paruošimas:

Sudedamosios dalys ištirpinamos vandenyje, pakaitinamos, jeigu būtina.

Patikrinamas pH su pH-metru (4.1.4) ir, jeigu būtina, naudojant natrio hidroksido ar druskos rūgšties tirpalą (mažiausia 0,1 mol/l koncentracijos), pH pakoreguojamas tokiu būdu, kad po sterilizacijos jis būtų $7,0 \pm 0,1$ 25 °C temperatūroje.

6.2. Skiediklio išpilstymas, sterilizavimas ir laikymas

Skiediklis (6.1) išpilstomas į mėgintuvėlius (4.2.1) tokiais kiekiais, kad po sterilizacijos kiekviename mėgintuvėlyje būtų $9,0 \pm 0,2$ ml skiediklio. Mėgintuvėliai užkemšami.

Sterilizuojama autoklave (4.1.2) 121 ± 1 °C temperatūroje 15 minučių. Patikrinamas skiediklio pH.

Jeigu skiediklis iš karto nenaudojamas, laikoma tamsoje, nuo 1 iki 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip vieną mėnesį po paruošimo.

6.3. Komerciniai sausieji skiedikliai

Skiediklis (6.1) gali būti paruoštas iš komercinių sausųjų tablečių ar miltelių. Ruošiama pagal gamintojo nurodymus. Pakoreguojama, kaip aprašyta 6.1 punkte ir ištirpinama, tirpikliai sterilizuojami ir laikomi kaip nurodyta 6.2 punkte.

7. Procedūra**7.1. Terpės ištirpinimas**

Prieš pradėdant mikrobiologinį tyrimą, greitai ištirpinamas reikiamas terpės kiekis ir terpė pakaitinama iki 45 ± 1 °C vandens vonioje (4.1.5).

7.2. Pieno mėginio paruošimas

7.2.1. Neatidarytą pasterizuoto pieno pakelį arba, jeigu tai yra neįmanoma, ne mažiau kaip 100 ml reprezentatyviojo mėginio išlaikyti 120 ± 2 valandas termostate (4.1.3 a), kurio temperatūra $6 \pm 0,5$ °C.

7.2.2. Po išlaikymo kruopščiai sumaišyti pieno mėginį tokiu būdu, kad mikroorganizmai pasiskirstytų kiek galima tolygiau, greitai apverčiant indą su pieno mėginiu 25 kartus. Vengti putojimo arba leisti putoms išsisklaidyti. Laikotarpis tarp maišymo ir pieno mėginio paėmimo neturi būti ilgesnis kaip trys minutės.

7.3. Pirmojo skiedinio paruošimas (10^{-1})

Sterilia pipete (4.2.3) įpilama 1 ml žalio ar pasterizuoto pieno mėginio (7.2.2) į 9 ml skiediklio (6.1), vengiant pipetės ir skiediklio sąlyčio. Skiediklio temperatūra turi būti apytikriai tokia pati, kaip ir pieno mėginio. Šis pirmasis skiedinys atsargiai maišomas 5–10 sekundžių maišytuve (4.1.9).

Tokiu būdu gaunamas pirmasis skiedinys 10^{-1} .

7.4. Kitų dešimtkarčių skiedinių paruošimas

1 ml pirmojo skiedinio (7.3) įpilama sterilia pipete (4.2.3) į 9 ml skiediklio (6.1) pagal 7.3. punkte pateiktus nurodymus.

Tokiu būdu yra gaunamas 10^{-2} skiedinys.

Šie veiksmai pakartojami siekiant, gauti tolimesnius dešimtkarčius skiedinius, kol tikimasi gauti atitinkamą mikroorganizmų skaičių (8.1).

7.5. Sėjimas į Petri lėkšteles

Į Petri lėkštelę (4.2.4) sterilia pipete (4.2.3) įpilama 1 ml mėginio ir (arba) atitinkamo dešimtkarčio skiedinio. Turi būti ištirti mažiausiai du skiediniai. Kiekvienam pasirinktam skiediniui (8.1) imama po dvi Petri lėkšteles.

7.6. Terpės supylimas

Į kiekvieną lėkštelę įpilama apytikriai nuo 15 iki 18 ml terpės (7.1).

Iš karto po pasėjimo gerai sumaišomas Petri lėkštelės turinys, kad po išlaikymo kolonijos tolygiai išsisklaidytų.

Pieno mėginys paruošiamas ir sumaišomas su terpe ne ilgiau kaip per 15 minučių.

Leidžiama sustingti ant švaraus, vėsaus, horizontalaus paviršiaus.

7.7. *Petri lėkštelių inkubacija*

Lėkštelės sudedamos į termostatą (4.1.3 b). Lėkštelės laikomos apverstos. Jos sudedamos viena ant kitos, ne daugiau kaip šešios. Sudėtų lėkštelių krūvos atskiriamos viena nuo kitos, taip pat nuo termostato sienelių ir viršaus.

Inkubuojama 25 valandas 21 ± 1 °C temperatūroje.

7.8. *Kolonijų skaičiavimas*

Kolonijos skaičiuojamos Petri lėkštelėse, kuriose išaugo ne daugiau nei 300 kolonijų.

Lėkštelės apžiūrimos neryškioje šviesoje. Kad būtų lengviau skaičiuoti, gali būti naudojamos tinkamos lupos (4.1.6) ir (arba) skaitiklis (4.1.8). Vengiama klaidinančių medžiagos nuosėdų dalelių skaičiuojant labai mažas kolonijas. Atsargiai ištiriami abejotini objektai, naudojant didesnio padidinimo lupas (4.1.7); ten, kur reikia, kolonijos atskiriamos nuo pašalinių medžiagų.

Išsiplėtusios kolonijos laikomos pavienėmis kolonijomis. Jeigu mažiau nei vienas ketvirtadalis lėkštelės yra priaugęs išsiplėtusių kolonijų, būtina suskaičiuoti kolonijas likusioje lėkštelės dalyje ir paskaičiuoti atitinkamą visos lėkštelės mikroorganizmų skaičių. Jeigu daugiau nei vienas ketvirtadalis lėkštelės yra priaugęs išsiplėtusių kolonijų, lėkštelė išmetama.

8. **Rezultatų skaičiavimas ir išraiška**

8.1. Naudojamas visų lėkštelių, kuriose išaugo nuo 10 iki 300 kolonijų, skaičius (žr. 8.3 ir 8.4 punktus).

8.2. Mikroorganizmų, esančių 1 ml pasteurizuoto pieno, skaičius yra išreiškiamas formule:

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

čia:

$\sum C$ – suma kolonijų, suskaičiuotų kaip nurodyta 8.1.1,

$(n_1 + 0,1n_2) d$ – atitinka mėginio, įpilto į lėkštelę, tūrį, kur:

n_1 – pirmojo skiedinio lėkštelių skaičius,

n_2 – antrojo skiedinio lėkštelių skaičius,

d – skiedimo koeficientas, atitinkantis pirmąjį skiedinį, kurio lėkštelės buvo atrinktos kolonijų skaičiavimui.

Skaičiavimo rezultatas suapvalinamas iki dviejų reikšminių skaičių. Kai apvalinamas skaičius yra 5, suapvalinama į kairę taip, kad būtų gautas lyginis skaičius.

Pavyzdys

Skiedinio 10^{-2} rezultatai 278 ir 290 kolonijų,

Skiedinio 10^{-3} rezultatai 33 ir 28 kolonijos

$$\begin{aligned} \text{Liczba/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28590 \\ &= 29000 \\ &= 2,9 \times 10^4 \end{aligned}$$

8.3. Jeigu yra tik lėkštelės, kuriose išaugo mažiau kaip 10 kolonijų, mikroorganizmų skaičius 1 mililitre išreiškiamas kaip „mažesnis už 10xd viename ml“; „d“ yra žemiausio skiedinio laipsnį atitinkantis atvirkštinis dydis.

8.4. Jeigu yra tik lėkštelės, kuriose išaugo daugiau kaip 300 kolonijų, bet įmanoma suskaičiuoti, kolonijų skaičius padauginamas iš skiedinio laipsnį atitinkančio atvirkštinio dydžio. Užrašyti rezultatą kaip „paskaičiuotas mikroorganizmų skaičius viename ml“.

9. **Tikslumas**

Tarptautiniu būdu pripažintų tarplaboratorinių tyrimų rezultatų dar nėra.

VI. KOLIFORMINIŲ BAKTERIJŲ SKAIČIAUS NUSTATYMAS PAGAL SKAIČIUOJAMAS KOLONIJAS 30 °C TEMPERATŪROJE

1. Taikymo sritis

Ši procedūra yra koliforminių bakterijų, esančių pasterizuotame piene, skaičiaus nustatymo pagrindinis metodas, naudojant kolonijų skaičiavimo metodą 30 °C temperatūroje. Užrašyti rezultatą kaip „paskaičiuotas mikroorganizmų skaičius viename ml“.

2. Apibrėžimas

„Koliforminės bakterijos“ yra bakterijos, kurios 30 °C temperatūroje formuoja būdingas arba nebūdingas kolonijas, kurios aprašytose sąlygose fermentuoja laktozę, išskirdamos dujas.

3. Principas

Tam tikras pieno mėginio kiekis yra sumaišomas Petri lėkštelėse su mitybine terpe ir inkubuojamas 24 valandas 30 °C temperatūroje. Yra suskaičiuojamos būdingosios kolonijos ir, jeigu būtina, yra patvirtinamas nebūdingųjų kolonijų tapatumas, nustatant jų pajėgumą fermentuoti laktozę. Po to yra paskaičiuojamas koliforminių bakterijų skaičius, esantis 1 ml pasterizuoto pieno.

4. Prietaisai ir stikliniai indai

Įprasta laboratorinė įranga:

4.1. Prietaisai

4.1.1. Sterilizavimo krosnis, kurioje palaikoma 170–175 °C temperatūra.

4.1.2. Autoklavas, kuriame palaikoma 121 ± 1 °C temperatūra.

4.1.3. Termostatas, kurio temperatūra visoje erdvėje yra 30 ± 1 °C.

4.1.4. PH-metras su temperatūros reguliavimu, graduotas 0,1 pH vieneto tikslumu.

4.1.5. Vandens vonia, palaikanti 45 ± 1 °C temperatūrą.

4.1.6. Metalinė kilpelė, pagaminta iš platinos ir iridžio ar nikelio ir chromo.

4.2. Stikliniai indai

4.2.1. 20 ml talpos tinkamai uždaryti mėgintuvėliai patikrinimo testo terpei (5.2) laikyti ir atitinkamų matmenų *Durham* vamzdeliai, naudojami su mėgintuvėliais.

4.2.2. Nuo 150 iki 250 ml talpos kolbos sausai mitybinei terpei (5.1) laikyti.

4.2.3. Pipetės (su vatos kamščiais), pagamintos iš stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos su nenulaužtu galu ir (1–10) ml talpos žyme, kurių ištėkėjimo angos skersmuo nuo 1,75 iki 3 mm.

4.2.4. Petri lėkštelės, pagamintos iš skaidraus nespaltoto stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos, kurių indo dugnas turi apie 90–100 mm vidinį skersmenį. Vidaus gylis turi būti ne mažesnis kaip 10 mm. Dugnas turi būti be nelygumų, trukdančių suskaičiuoti kolonijas.

4.2.5. Stiklinių indų sterilizavimas

Stikliniai indai turi būti sterilizuojami naudojant vieną iš šių būdų:

a) laikant juos ne trumpiau kaip vieną valandą sterilizavimo krosnyje, nuo 170 °C iki 175 °C (4.1.1) temperatūroje;

b) laikant juos ne trumpiau kaip 20 minučių autoklave, 121 ± 1 °C temperatūroje (4.1.2)

Būtina autoklave užtikrinti pakankamą garų prasiskverbimą — t. y., jeigu įranga yra sterilizuojama induose, jie neturi būti aklinau uždaryti, kolbos turi būti su atlaisvintais kamščiais.

Autoklave sterilizuoti stikliniai indai turi būti išdžiovinoti išleidus garą.

Pipetės turi būti sterilizuotos sterilizavimo krosnyje (4.1.1).

5. **Mitybinė terpė**5.1 *Violetiniai raudonas tulžies, laktozės agaras (VRBL agaras). Sausa selektyvinė terpė.*

Sudėtis:

Peptono	7 g
Mielių ekstrakto	3,0 g
Laktozės ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10,0 g
Natrio chlorido (NaCl)	5,0 g
Tulžies rūgšties druskos	1,5 g
Neutralaus raudonojo indikatoriaus	0,03 g
Kristalinio violetinio indikatoriaus	0,002 g
Agaro nuo	10 iki 15 g (priklausomai nuo naudojamo agaro sudaromo gelio tvirtumo)
Vandens	1 000 ml.

Paruošimas:

Sudedamosios dalys pasveriamos ir ištirpinamos vandenyje, paliekamos stovėti keletą minučių, po to energingai išmaišoma.

Su pH-metru (4.1.4) patikrinama pH ir, jei būtina, naudojant natrio hidroksido ar druskos rūgšties tirpalą (mažiausia 0,1 mol/l koncentracijos), pH pakoreguojama tokiu būdu, kad po sterilizavimo jis būtų $7,4 \pm 0,1$, $25^\circ C$ temperatūroje.

Greitai užvirinama, kartais pamaišant ir tuoj pat išpilstoma į sterilius 100–150 ml talpos kolbas (4.2.2). Terpė pakaitinama vandens vonioje (4.1.5) $45 \pm 1^\circ C$ temperatūroje.

Terpės sterilumas turi būti patikrintas naudojimo metu (6.4).

Terpė naudojama trijų valandų laikotarpyje nuo jos paruošimo.

5.2. *Brilantinės žalumos laktozės jaučio tulžies buljonas. Patikrinimo testo terpė.*

Sudėtis:

Peptono	10 g
Laktozės ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Bevandenės jaučių tulžies	20 g
Brilantinės žalumos	0,0133 g
Vandens	1 000 ml

Paruošimas:

Sudedamosios dalys ištirpinamos vandenyje užverdant.

Su pH-metru (4.1.4) patikrinama pH ir, jei būtina, naudojant (mažiausiai 0,1 mol/l) natrio šarmo ar druskos rūgšties tirpalą, pH sureguliuojamas tokiu būdu, kad po sterilizacijos jis būtų $7,2 \pm 0,1$, $25^\circ C$ temperatūroje.

Terpė išpilstoma po 10 ml į mėgintuvėlius (4.2.1), kuriuose yra *Durham* vamzdeliai. Mėgintuvėliai užkemšami.

Sterilizuojama autoklave (4.1.2) $121 \pm 1^\circ C$ temperatūroje 15 minučių.

Durham vamzdeliuose po sterilizavimo neturi likti oro burbulų.

Patikrinama terpės pH.

Jeigu terpė nėra iš karto sunaudojama, ji laikoma tamsoje, nuo 0 iki $5^\circ C$ temperatūroje ne ilgiau kaip vieną mėnesį nuo paruošimo.

5.3. *Komercinė sausoji mitybinė terpė.*

Mitybinė terpė (5.1, 5.2) gali būti paruošta iš komercinės sausosios terpės. Laikomasi gamintojo nurodymų. Sureguliuojama pH ir išpilstoma, virinama arba sterilizuojama ir terpė laikoma, kaip aprašyta 5.1 ir 5.2 punktuose.

6. **Procedūra**6.1. *Terpė*

Terpė (VRBL agaras) naudojama kaip nurodyta 5.1 punkte.

6.2. *Pieno mėginio paruošimas*

Pieno mėginys kruopščiai išmaišomas greitai vartant indą su pieno mėginiu 25 kartus tokiu būdu, kad mikroorganizmai pasiskirstytų kiek galima tolygiau. Vengiama putojimo arba neleidžiama putoms pasklisti. Laiko tarpas tarp sumaišymo ir pieno mėginio paėmimo neturi būti ilgesnis kaip trys minutės.

6.3. *Sėjimas į Petri lėkšteles*

3 ml pieno mėginio (6.2) sterilia pipete (4.2.3) supilstomi po 1 ml pieno mėginio į kiekvieną iš trijų lėkštelių (4.2.4).

6.4. *Išpilstymas*

Išpilstoma maždaug apie 12 ml gryno VRBL agaro (6.1) į kiekvieną lėkštelę ant pieno mėginio.

Iš karto po išpilstymo, Petri lėkštelė maišoma sukant taip, kad kolonijos tolygiai išsisklaidytų po inkubacijos.

Laikas tarp pieno mėginio paruošimo ir mėginio sumaišymo su terpe neturi būti ilgesnis kaip 15 minučių.

Paruošiama kontrolinė lėkštelė su 12 ml VRBL agaro jo sterilumui patvirtinti.

Leidžiama sustingti ant švaraus vėsaus horizontalaus paviršiaus.

Kai terpė visai sustingsta, užsėtos tepės paviršiaus užpilama mažiausiai 4 ml VRBL agaro (6.1).

Leidžiama sustigti.

6.5. *Petri lėkštelių inkubacija*

Lėkštelės sudedamos į termostatą (4.1.3). Lėkštelės laikomos apverstos. Jas sudedame vieną ant kitos, ne daugiau kaip šešias. Sudėtų lėkštelių krūvos turi būti atskirtos viena nuo kitos, taip pat nuo termostato sienelių ir viršaus.

Inkubuojama 24 ± 2 valandas 30 ± 1 °C temperatūroje.

6.6. *Kolonijų skaičiavimas*

6.6.1. Kolonijos suskaičiuojamos Petri lėkštelėse, turinčiose ne daugiau kaip 150 kolonijų. Suskaičiuojamos tamsiai raudonos spalvos kolonijos, mažiausiai 0,5 mm skersmens, kurios yra arba nėra apsuptos nuosėdomis, būdingomis koliforminėms bakterijoms.

6.6.2. Jeigu visos arba kelios kolonijos turi nebūdingus aspektus (pvz., nuo tipišų kolonijų skiriasi spalva, dydžiu ar nuosėdų formavimu), reikia atlikti patikrinimo testą (6.7).

6.7. *Patikrinimo testas*

Pagal 6.6.2 punktą nurodytus požymius atlikamas patikrinimo testas, pasirenkant tinkamą skaičių (pvz., nuo trijų iki penkių) nebūdingų kolonijų ir pasėjant jas briliantinės žalos laktozės jaučio tulžies buljone (5.2), naudojant metalinę kilpelę (4.1.6). Mėgintuvėliai inkubuojami 30 ± 1 °C temperatūroje 24 ± 2 valandas.

Kolonijas, kurios sudaro dujas *Durham* vamzdeliuose, laikyti koliforminėmis bakterijomis.

7. **Rezultatų paskaičiavimas ir išraiška**

7.1. Rezultatų skaičiavimui (žr. 7.4) naudojamos tos lėkštelės, kuriose yra ne daugiau kaip 150 kolonijų.

7.2. Jeigu yra atliekamas patikrinimo testas, paskaičiuojamas koliforminių bakterijų kolonijų skaičius iš patikrinto koliforminių bakterijų kolonijų procento.

7.3. 1 ml pasteurizuoto pieno esantis koliforminių bakterijų skaičius yra išreiškiamas pagal formulę:

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

kurioje:

ΣC bendras koliforminių bakterijų kolonijų skaičius (7.1 kartu su 7.2), nustatytas tiriant pieno mėginį (3 ml),

n ištirto mėginio (6.3) mililitrų skaičius (3 ml).

Jeigu yra daugiau kaip 100 kolonijų, skaičiavimo rezultatas yra pateikiamas iki dviejų reikšminių skaičių. Jei skaičius, kurį reikia suapvalinti, yra penki, suapvalinti tokiu būdu, kad pirmasis skaičius kairėje būtų lyginis.

Jeigu yra tik tokie skaičiavimo rezultatai, kurie viršija 150 kolonijų, rezultatas užrašomas kaip „paskaičiuotų koliforminių bakterijų skaičius 1 ml“.

8. **Tikslumas**

Tarptautiniu būdu pripažintų tarplaboratorinių tyrimų rezultatų nėra.

VII. SOMATINIŲ LĄSTELIŲ SKAIČIAUS NUSTATYMAS

Ši procedūra apima dvi procedūras, kurios yra pamatiniai metodai somatinių ląstelių skaičiui nustatyti. Tai:

- A. Mikroskopinis metodas
- B. Fluoro optoelektroninis metodas

A. Mikroskopinis metodas

1. Taikymo sritis

Ši procedūra yra pamatinis metodas somatinių ląstelių žaliame piene skaičiui nustatyti.

Ši procedūra apibrėžia ląstelių skaičiaus pieno mėginyje nustatymo metodą, skirtą kalibruoti ir patikrinti fluoro optoelektroninio metodo tikslumą (žr. B. 1).

2. Apibrėžimas

Šiame metode somatinės ląstelės yra tos ląstelės, kurių branduolys gali būti aiškiai nudažytas, naudojant metileno mėlį, pvz., leukocitai ir epitelinės ląstelės.

3. Principas

0,01 ml pieno paskleidžiama ant 1 cm² mikroskopinio stiklo plokštelės. Susidariusi plėvelė yra išdžiovinama ir nudažoma. Skaičiuojant naudojama mikroskopu. Norint gauti 1 ml esančių ląstelių skaičių, somatinių ląstelių skaičius, suskaičiuotas konkrečiame plote, yra padauginamas iš darbinio koeficiento.

4. Reagentai

Turi būti naudojami analizinio grynumo reagentai.

Dažų tirpalas:

Sudėtis:

Metileno mėlio	0,6 g
Etanolio – 99 %	54 ml
1,1,1 – trichloretoano arba tetrachloretoano	40 ml
Ledinės acto rūgšties	6 ml

Ispėjimas

Tetrachloretoanas yra nuodingas. Jo tirpalai ruošiami ir jais naudojama traukos spintoje.

P a r o š i m a s:

Etanolis ir 1,1,1-trichloretoanas arba tetrachloretoanas išmaišomi butelyje ir kaitinami vandens vonioje iki 60–70 °C. Pridedama metileno mėlio, atsargiai išmaišoma, atšaldoma šaldytuve iki 4 °C per 12–24 valandas ir įpilama ledinės acto rūgšties. Nufiltruojama per filtrą, kurio porų dydis nuo 10 iki 12 mikronų ar mažesnis, ir dažų tirpalas laikomas hermetiškame butelyje. Jeigu susidaro dalelės arba nuosėdos, prieš naudojant nufiltruojama dar kartą.

5. Prietaisai ir stikliniai indai

- 5.1. Mikroskopas, padidinantis nuo 500 iki 1 000 kartų.
- 5.2. 0,01 ml mikrošvirkštas, $\pm 2\%$ ar didesnio tikslumo.

- 5.3. *Mikroskopo stiklai*, turintys pažymėtą 20 mm × 5 mm būsimos plėvelės kontūrą arba etaloninis mikroskopo stiklas, kurio matmenys 20 mm × 5 mm.
- 5.4. *Horizontali plytelė* su nustatyta (30–50)°C temperatūra mikroskopo stiklams džiovinti.
- 5.5. *Džiovintuvas* (plaukų džiovintuvas) plėvelei džiovinti.
- 5.6. *Vandens vonia*, palaikanti (30–40)°C temperatūrą, skirta pieno mėginiui kaitinti.
- 5.7. *Mikrometro stiklas* su 0,01 mm padalomis.

6. **Procedūra**

6.1. *Pieno mėginys*

Pieno mėginys turi būti ištirtas per šešias valandas nuo mėginio paėmimo. Laikymo metu mėginio temperatūra neturi viršyti 6 °C. Reikia vengti užšalimo.

6.2. *Mėginio paruošimas laboratorijoje*

Mėginys pakaitinamas vandens vonioje (5.6) iki 30–40 °C temperatūros. Po to atsargiai išmaišoma. Atšaldoma iki mikrošvirkšto kalibravimo temperatūros (5.2), pvz., iki 20 °C.

6.3. *Išankstinis stiklo plokštelių paruošimas*

Stiklinės plokštelės nuvalomos, pvz., etilo spiritu, nusausinamos nedulkanciu popieriumi, palai-komos liepsnoje ir atvėsinaamos. Laikoma dėžutėje, kad neprisidulėtų.

6.4. *Plėvelės paruošimas*

Iš paruošto, kaip aukščiau nurodyta, pieno mėginio mikrošvirkštu (5.2) paimama 0,01 ml pieno. Švirkšto išorinė dalis, kuri liečiasi su pienu, kruopščiai nuvaloma. Švirkštas padedamas ant stiklinės plokštelės (5.3), iš pradžių nubrėžiant (20 mm × 5 mm) formos kontūrą. Po to kiek galima lygiau užpildomas plotas. Visiškai išdžiovinama plėvelė ant horizontalios plytelės (5.4).

Iš kiekvieno pieno mėginio turi būti paruošta ir ištirta mažiausia dvi plėvelės.

6.5. *Plėvelių dažymas*

10 minučių panardinamos į dažų tirpalą (4). Jeigu reikalinga, džiovinimas užbaigiamas džiovin-tuvu (5.5). Plėvelės padedamos po bėgančiu iš čiaupo vandeniu, kol nusiplaš visas dažų pertek-lius. Tada vėl išdžiovininti ir laikyti saugant nuo dulkių.

6.6. *Mikroskopo lauko kalibravimas*

Priklausomai nuo pasirinkto padidinimo (× 500 iki × 1 000), mikrometro stiklu (5.7) nustato-mas mikroskopo lauko skersmuo.

7. **Suskaiciavimas ir paskaičiavimas**

7.1. *Ląstelių suskaiciavimas ir paskaičiavimas*

Naudojamas mikroskopas (5.1). Vietoj ląstelių yra suskaiciuojami tik ląstelių branduoliai. Jie turi būti aiškiai atpažįstami ir ne mažiau kaip pusė branduolių turi būti matomi mikroskopo lauke. Branduoliai skaičiuojami plėvelės viduriniame trečdalyje vertikaliomis juostelėmis; neskaičiuo-jama pasirenkant tik pakraštines plėvelės juosteles. Plėvelių paruošimo tinkamumas ir rezultatų patikimumas turi būti tikrinami ne rečiau kaip vieną kartą per mėnesį, suskaiciuojant branduo-lius skirtinguose plėvelės plotuose. Branduolius galima suskaiciuoti, paskirsčiusius sistemoje mik-roskopo laukus tokiu būdu, kad visos plėvelės dalys būtų reprezentuojamos vienodai.

7.2. *Minimalus suskaiciuotinas ląstelių skaičius*

Kadangi mikroskopinis somatinių ląstelių suskaiciavimas taip pat gali būti naudojamas automa-tinių ir mechanizuotų suskaiciavimo procedūrų standartizavimui, identišių mėginių suskaicia-vimo rezultatų variacijos koeficientas neturi būti didesnis už šį elektroninių prietaisų koeficientą. Pieno mėginio, kuriame yra nuo 400 000 iki 600 000 ląstelių/ml, variacijos koeficientas neturi viršyti 5 %.

Norint įvykdyti rezultatų pakartojamumo reikalavimą, somatinių ląstelių skaičius, kuris turi būti suskaičiuotas kiekviename mėginyje pagal Puasono pasiskirstymo charakteristikas turi būti ne mažiau kaip 400.

Puasono pasiskirstymo būdinga prielaida, kad

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

čia:

M — vidurkis,

V — variantiškumas

Variacijos koeficientas yra:

s — standartinis nuokrypis.

Variacijos koeficientas yra:

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

čia M — vidurkis, rodantis suskaičiuotų dalelių (ląstelių) skaičių (t. y. 400, kai CV = 5 %);

7.3. Darbinio koeficiento paskaičiavimas

Naudojant 0,01 ml pieno, koeficientas yra paskaičiuojamas pagal 7.3.1 arba 7.3.2.

7.3.1. Plėvelės juostelių suskaičiavimas

Kiekvienos iš suskaičiuojamų juostelių ilgis turi būti 5 mm. Juostelės plotis atitinka mikroskopo lauko skersmenį, nustatomą mikrometro stiklo plokštelė (5.7).

Darbinis koeficientas:

$$W_f = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

čia:

d — mikroskopo lauko skersmuo, nustatytas mikrometro stiklo plokštelės (5.7)

b — visiškai suskaičiuotų juostelių skaičius.

7.3.2. Skaičiuojant mikroskopo laukų plėvelės viduriniame trečdalyje arba su tinkleliu, darbinis koeficientas apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia:

d — mikroskopo lauko skersmuo, nustatytas mikrometro stiklu (6.7), mm;

s — suskaičiuotų laukų skaičius.

7.4. Ląstelių kiekio paskaičiavimas

Norint nustatyti ląstelių skaičių, esantį 1 ml pieno, suskaičiuotų somatinių ląstelių skaičius (7.1 ir 7.2) yra padauginamas iš darbinio koeficiento.

7.5. Tikslumas

Variacijos koeficientas (žr. 7.2) neturi viršyti 5 %.

Tarptautiniu mastu pripažintų tarplaboratorinių tyrimų rezultatų nėra.

B. Fluoro optoelektroninis metodas

1. Taikymo sritis

Ši procedūra yra pamatinis metodas, kuriuo, atlikus tinkamą kalibravimą (žr. A.1), gali būti suskaičiuotos somatinės ląstelės žaliame piene — su cheminiais konservantais ar be jų.

2. **Apibrėžimas**

Šiame metode somatinės ląstelės yra dalelės, kurios turi minimalų fluorescencinį intensyvumą, susijusį su DNR nudažymu somatinių ląstelių branduoliuose.

3. **Principas**

Pieno mėginys (pvz., 0,2 ml) yra kruopščiai sumaišomas su buferiniu tirpalu ir fluorescenciniu tirpalu. Po to dalis šio mišinio yra paskleidžiama plonu sluoksneliu ant besisukančio disko, kuris yra mikroskopo objektinis stiklėlis.

Kiekviena ląstelė sukuria elektroninį impulsą, kuris yra sustiprinamas ir užrašomas. Somatinių ląstelių skaičius yra atspausdinamas tūkstančiais į ml.

4. **Reagentai**

Nesant kitų nurodymų, turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai. Turi būti naudojamas distiliuotas, dejonizuotas ar analogiško grynumo vanduo.

4.1. *Buferinis tirpalas*

Sudėtis:

Natrio vandenilio ftalato	51,0 g
Kalio hidroksido	13,75 g
1 % (pagal tūrį) polietilenglikolio – mono-p (1,1,3,3-tetrametilbutil) – fenilo eterio (pvz., trinitrotoluolas X×100)	10 ml
pH nuo 5,7 iki 5,9. Praskiedžiama vandeniu iki 10 000 ml.	

Paruošimas:

Sumaišomos atskiros sudėtinės dalys. Jos turi būti laikomos hermetiškoje aplinkoje ne ilgiau kaip 7 dienas.

4.2. *Fluorescencinis tirpalas (pagrindinis tirpalas)*

Sudėtis:

Etidžio bromido	1,0 g
-----------------	-------

Praskiedžiama vandeniu iki 1 000 ml.

Paruošimas:

Etidžio bromidas ištirpinamas vandenyje. Laikoma šviesos ir oro nepraleidžiančiuose buteliuose ne ilgiau kaip 2 mėnesius.

4.3. *Fluorescencinis tirpalas (darbinis tirpalas)*

Norint gauti 1 000 ml tirpalo, 20 ml pagrindinio tirpalo (4.2) sumaišoma su buferiniu tirpalu (4.1). Darbinis tirpalas neturi būti naudojamas ilgiau kaip 7 dienas.

4.4. *Skaidrinantis tirpalas*

Sudėtis:

Buferinio tirpalo (4.1)	10 ml
1 % (pagal tūrį) polietilenglikolio – mono-p (1,1,3,3-tetrametilbutil) – fenilo eterio (pvz., trinitrotoluolo X – 100)	10 ml
25 % (pagal tūrį) amoniako	25 ml

Praskiedžiama vandeniu iki 10 000 ml.

Paruošimas:

Sumaišomos atskiros sudėtinės dalys. Laikoma ne ilgiau kaip 30 dienų.

5. **Prietaisai ir stikliniai indai**

5.1. *Suskaičiavimo prietaisas, dirbantis pagal fluorescencinį optinį principą.*

Pastaba

Prieš naudojant turi būti atliktas prietaiso kalibravimas. Tokiu būdu yra nustatomas ryšys tarp suskaičiuotinių dalelių tūrio ir slenkstinio lygio, virš kurio yra atliekamas suskaičiavimas. Prietaiso kalibravimas yra atliekamas pagal gamintojo nurodymus, naudojant mėginius, kurių ląstelių kiekis buvo nustatytas naudojant (A) mikroskopinį metodą.

5.2. Cirkuliacinė vandens vonia, palaikanti 40 ± 1 °C temperatūrą.

5.3. Mėgintuvėlis, sandariai uždarytas apie 15 ml tūrio.

6. Pieno mėginys

6.1. Mėginys turi būti laikomas mėgintuvėlyje (5.3) žemoje temperatūroje. Jeigu mėginys yra be cheminių konservantų, suskaičiavimas neturi būti atliekamas per pirmąsias 24 val. po pamelžimo, kadangi suskaičiavimo rezultatas bus per mažas. Laikymo temperatūra neturi būti aukštesnė kaip 6 °C.

6.2. Konservavimas

Cheminis konservavimas turi būti atliekamas per 24 valandas. Konservavimas turi būti atliekamas kiek galima greičiau po mėginių paėmimo.

6.2.1. Cheminis mėginio konservavimas gali būti atliekamas pridėjus vieną iš šių konservantų:

— borato rūgštį:

galutinė borato rūgšties koncentracija mėginyje neturi viršyti 0,6 g/100 ml. Tokiu būdu konservuotas mėginys gali būti laikomas ne ilgiau kaip 24 valandas 6–12 °C temperatūroje;

— kalio dichromatą:

galutinė kalio dichromato koncentracija neturi būti didesnė kaip 0,2 g/100 ml. Tokiu būdu konservuoti mėginiai gali būti laikomi iki 72 valandų 6–12 °C temperatūroje;

— natrio azidą:

mėginiai gali būti konservuojami su natrio azidu, kurio galutinė koncentracija 0,024 g/100 ml su sąlyga, jei mėginys tuojau pat po jo paėmimo yra atšaldomas iki 6–12 °C temperatūros ir suskaičiavimas atliekamas per 48 valandas po mėginio paėmimo;

— bronopolą:

mėginys gali būti konservuojamas bronopolu naudojant galutinę koncentraciją 0,05 g/100 ml, su sąlyga, kad iš karto po paėmimo mėginys yra atšaldomas iki 6–12 °C ir suskaičiavimas atliekamas per 72 valandas po paėmimo.

6.2.2. Borato rūgštimi konservuotas mėginys gali būti toliau konservuojamas 48 valandoms naudojant kalio dichromatą.

Pastaba

Mėginius konservuojant kalio dichromatu turi būti prisilaikoma vietinių reikalavimų, susijusių su nutekamuju vandeniu.

7. Procedūra

7.1. Išankstinis mėginio apdorojimas

Tiriamasis pienas po pamelžimo turi būti laikomas 2–6 °C temperatūroje ne trumpiau kaip 24 valandas. Pamelžimo dieną nepartartina tirti nekonservuotus mėginius, nes rezultatai gali būti per maži. Jeigu tokį mėginį yra būtina tirti, jis turi būti iš anksto apdorojamas mažiausiai tris valandas kalio dichromatu (žr. 6.2.1).

7.2. Paruošimas

Iš anksto apdorotas mėginys (žr. 7.1) arba neapdorotas mėginys, kuris yra mažiausia vienos dienos senumo, yra kaitinamas vandens vonioje (5.2) iki apytikriai 40 °C. Po to iki tyrimo mėginys yra laikomas kambario temperatūroje.

7.3. Ląstelių suskaičiavimas

Suskaičiavimas gali būti atliktas naudojant suskaičiavimo prietaisą (5.1) per 15 minučių po kaitinimo pabaigos (žr. 7.2). Iš karto prieš suskaičiuojant, mėginys turi būti kruopščiai išmaišytas, kad būtų pasiektas kiek galima homogeniškesnis somatinių ląstelių pasiskirstymas.

Tolimesnis mėginio praskiedimas ir paruošimas atliekamas prietaise automatiškai.

8. Tikslumas

Nėra tarptautiniu mastu pripažintų tarplaboratorinių tyrimų rezultatų pakartojamumo (r) ir atkuriamumo (R) skaičių. Tikslumo duomenys bus pateikti ateityje.

Nacionaliniame lygmenyje turimi duomenys leidžia atlikti šiuos paskaičiavimus:

1) Suskaičiuotų ląstelių skaičius nuo 400 000 iki 500 000/ml

— standartinis rezultatų pakartojamumo nuokrypis:

$$s_r = 20\,000 \text{ ląstelių/ml}$$

(lygiavertis 5–4 % variacijos koeficientui)

— standartinis atkuriamumo nuokrypis:

$$s_r = 40\,000 \text{ ląstelių/ml}$$

(lygiavertis 10–8 % variacijos koeficientui).

9. Tikslumo kontrolė

Tikslumo kontrolė yra atliekama naudojant mėginius su žinomu ląstelių kiekiu, kuris yra nustatytas suskaičiavus ląsteles mikroskopu nacionalinėje akredituotoje tyrimų laboratorijoje.

VIII. ANTIBIOTIKŲ IR SULFAMIDŲ NUSTATYMAS

TAIKYMO SRITIS

Ši procedūra yra pamatinis antibiotikų ir sulfamidų nustatymo žaliame ir termiškai apdorotame piene metodas.

Pamatinis metodas apima:

A. Kokybinį metodą

Tai yra pirminis metodas, kurio metu yra atrenkami antibiotikus ir sulfamidus turintys pieno mėginiai. Aprašytame metode kaip testavimo kultūra naudojamas *Bacillus stearothermophilus* var *calidolactis*, ATTC 10 149. Ši procedūra buvo pasirinkta kaip atstovaujanti šiuos tyrimus;

B. Penicilino patvirtinimo ir identifikavimo metodą.

Šis metodas turi būti naudojamas patvirtinti kokybinio metodo rezultatus, identifikuoti peniciliną ir nustatyti penicilino koncentraciją.

A. Kokybinis metodas

1. Taikymo sritis

Tai kokybinio antibiotikų ir sulfamidų nustatymo žaliame ir termiškai apdorotame piene metodas, kuomet jie aukštesni nei lentelėje nurodytos ribos:

Įvairių antibiotikų ir sulfamidų koncentracijos, kurias galima nustatyti ⁽¹⁾

	Tyrimo jautrumas	
	Visi neigiami	Visi teigiami
Benzilpenicilinas	0,002	0,006
Ampicilinas	0,002	0,005
Kloksacilinas	0,015	0,035
Nafcilinas	0,006	0,011
Tetraciklinas	0,10	0,40
Oksitetraciklinas	0,20	0,45
Chlortetraciklinas	0,15	0,50
Chloramfenikolis	7,0	15,0
Dihidrostreptomocinas	4,0	13,0
Neomicinas	1,0	22,0
Kanamocinas	9,0	28,0
Bacitracinas	0,06	0,14
Eritromocinas	1,0	2,25
Rifamicinas	0,01	0,14
Diafenilsulfonas	0,01	0,1
Sulfametazinas (Sulfadimidinas)	0,5	1,0

⁽¹⁾ Benzilpenicilinas ir bacitracinas yra išreikšti kaip TV/ml, visi kiti antibiotikai kaip µg/ml.

2. Apibrėžimas

Piene yra antibiotikai arba sulfamidai, kada terpės spalva nepasikeičia (žr. 7.1).

3. Principas

Pieno mėginys kartu su mitybinėmis medžiagomis yra įpilamas į agarą gelį, kuriame yra pH indikatorius ir *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis* ATCC 10 149 sporos (žr. 5.4.1), kurios turi gerą bendrą jautrumą ir yra ypač jautrios užterštumui penicilinu. Inkubacija, kurios pasekoje vyksta normalus mikroorganizmo augimas ir rūgšties gaminimas, yra pH indikatoriaus spalvos pasikeitimo iš purpurinės į geltoną priežastis. Kada piene yra medžiagos, trukdančios mikroorganizmo augimui, pH indikatoriaus spalva lieka purpurinė.

4. Prietaisai ir stikliniai indai

Paprastai yra naudojama ši laboratorinė įranga:

4.1. Prietaisai

- 4.1.1. Termostatas, palaikantis 64 ± 1 °C temperatūrą.
- 4.1.2. Vandens vonia, palaikanti 64 ± 1 °C temperatūrą.
- 4.1.3. Stovėlis mėgintuvėliams arba ampulėms.
- 4.1.4. Pipetė, vienkartinio naudojimo antgaliukai, tinkamai paimti ir išpilti po 0,1 ml mėginio.
- 4.1.5. Pincetai ar žnyplės.
- 4.1.6. Sterilizavimo krosnis, palaikanti 170–175 °C temperatūrą.
- 4.1.7. Autoklavas, palaikantis 121 ± 1 °C temperatūrą.
- 4.1.8. PH – metras.

4.2. Stikliniai indai

- 4.2.1. Mėginių buteliai su tinkamais kamščiais.

Pastaba

Kai kurie guminiai kamščiai gali nusėdinti inhibitorines medžiagas ant butelio kaklelio.

- 4.2.2. Petri lėkštelės, pagamintos iš skaidraus nespalsvoto stiklo ar sterilios sintetinės medžiagos su vienodo storio plokščiais dugnais, kurių minimalus vidinis skersmuo yra apie 140 mm.
- 4.2.3. 250 ml talpos buteliai.
- 4.2.4. Stiklinės arba sterilios sintetinės medžiagos užkemšamos vata pipetės, kurių talpa 1 ml ir 10 ml.
- 4.2.5. Stiklinės mentelės.
- 4.2.6. Mėgintuvėliai arba ampulės, kurių vidinis skersmuo apie 8 mm su užmovomis arba kamščiais.
- 4.2.7. Stiklinių indų sterilizavimas.

Stikliniai indai turi būti sterilizuojami naudojant vieną iš šių procedūrų:

- a) laikant juos ne trumpiau nei vieną valandą sterilizavimo krosnyje 170–175 °C temperatūroje (4.1.6);
- b) laikant juos ne trumpiau kaip 20 minučių autoklave 121 ± 1 °C temperatūroje (4.1.7).

Būtina užtikrinti autoklave pakankamą garų prasiskverbimą, pav., jeigu įranga yra sterilizuojama induose, jie neturi būti aklinai uždaryti, kolbų kamščiai turi būti atlaisvinti.

Autoklave sterilizuoti stikliniai indai turi būti išdžiovinti išleidus garą.

Pipetės turi būti sterilizuojamos karšto oro krosnyje.

5. Terpė, tirpalai, testavimo mikroorganizmas

Terpės sudėtinės dalys turi būti tinkamos bakteriologiniams tikslams. Turi būti naudojamas distiliuotas arba demineralizuotas bent jau analogiško grynumo vanduo. Jame neturi būti medžiagų, trukdančių testavimo mikroorganizmui augti.

5.1. *Terpė*

5.1.1. Mitybinis agaras

Sudėtis:

Mielų ekstrakto	2 g
Peptono	5 g
Mėsos ekstrakto	1 g
Natrio chlorido	5 g
Agaro	10–15 g
Vandens	1 000 ml

Paruošimas

Sudedamosios dalys ištirpinamos vandenyje. Užvirinamos, kartas nuo karto pamaišant. pH sureguliuojamas tokiu būdu, kad po sterilizacijos 25 °C temperatūroje jis būtų 7,4 ± 0,1.

Išpilstoma 10 ml kiekiais į mėgintuvėlius, kad agaras sustingtų nuožulniai arba po 100 ml į butelius.

Sterilizuojama 15 minučių 121 ± 1 °C temperatūroje.

5.1.2. Agaro terpė

Sudėtis

Natrio chlorido	2 g
Agaro	15 g
Vandens	1 000 ml
Trimetoprimo ar tetroksoprimo tirpalo (žr. 5.1.3) ⁽¹⁾	10 ml

Paruošimas

Vandenyje ištirpinamos sudėtinės dalys, išskyrus trimetoprimą ar tetroksoprimą. Užvirinamos kartas nuo karto pamaišant. Pridedama trimetoprimo ar tetroksoprimo ir 15 min. sterilizuojama 121 ± 1 °C temperatūroje, pH sureguliuojamas tokiu būdu, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų 7,0 ± 0,1.

5.1.3. Trimetoprimo ar tetroksoprimo tirpalas

Sudėtis

Trimetoprimo	5 mg
arba tetroksoprimo	30 mg
96 % etilo spirito	5 ml/30 ml
Vandens iki	1 000 ml

Paruošimas

Trimetoprimas ar tetroksoprimas ištirpinamas etilo spirite (5 ar 30 ml) ir atskiedžiama vandeniu.

5.1.4. Mitybinė terpė

Sudėtis

Mielų ekstrakto	0,75 mg
Gliukozės	5,0 mg
Tirpus krakmolo	8,0 mg
Bromkrezolo purpurinio indikatoriaus	0,025 g
Vandens iki	50 ml

Paruošimas

Mitybinės medžiagos ir indikatorius ištirpinami vandenyje, jeigu būtina, pakaitinama, filtruojama ir sterilizuojama. Komercinės mitybinės medžiagos yra gaunamos tablečių forma.

5.2. *Etaloniniai penicilino tirpalai*

5.2.1. Paruošiama 60 µg/ml = (100 TV/ml) penicilino tirpalo, ištirpinant kristalinį natrio arba kalio benzilpeniciliną steriliame distiliuotame vandenyje tinkamai užkimštame steriliame butelyje.

5.2.2. Paruošiamas penicilino darbinis tirpalas, atskiedžiant 1,25 ml penicilino tirpalo (5.2.1) iki 1 000 ml steriliu distiliuotu vandeniu. Šiame darbiniame tirpale yra 0,075 µg (= 0,125 TV/ml) penicilino.

5.2.3. Paruošiama 75 ml etaloninio penicilino tirpalo, kuriame yra 0,004 µg/ml (= 0,0067 TV/ml) penicilino, pridedama 71 ml pieno be inhibitorių (5.3) į 4 ml darbinio penicilino tirpalo (5.2.2) ir išmaišoma.

⁽¹⁾ Naudojant kultūrų terpes, turinčias antifolatinės medžiagas, būtina laikytis patentavimo teisės aktų.

- 5.2.4. 5.2.1–5.2.3 punktuose nurodyti penicilino tirpalai turi būti paruošti tą dieną, kada atliekamas tyrimas.

5.3. *Pienas be inhibitorių*

Kontrolei naudojamas pienas be inhibitorių, gaunamas ištirpinant steriliame distiliuotame vandenyje nugriebto pieno miltelius (10 % pagal masę tūryje), kurie buvo prieš tai ištirti ir nustatyta, kad jie neturi inhibitorinių medžiagų. Arba pakankamas žalio pieno kiekis, kuris buvo ištirtas ir nustatyta kaip neturintis inhibitorinių medžiagų, gali būti išpilstytas į butelius, kaitinamas vieną valandą 100 °C temperatūroje ir po to laikomas šaldytuve (0–6) °C temperatūroje ne ilgiau kaip vieną savaitę.

5.4. *Testavimo mikroorganizmas*

- 5.4.1. *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactus* padermė ATCC 10 149 yra naudojama kaip testavimo mikroorganizmas. Padermė yra identiška C 953.

- 5.4.2. Testavimo kultūros palaikymui paruošiama *kolekcinė kultūra*. Testavimo kultūra yra laikoma ant nuožulniai sustingdinto agaro (5.1.1). Testavimo kultūra kilpa pasėjama ant nuožulniai sustingdinto agaro paviršiaus ir inkubuojama aerobinėmis sąlygomis 48 valandas 63 ± 1 °C temperatūroje. Po inkubavimo mėgintuvėlis yra užkemšamas naudojant sterilų guminį kamštį. Tokiu būdu gauta pagrindinė kultūra gali būti keletą mėnesių laikoma šaldytuve nuo 0 iki 5 °C temperatūroje.

5.5. *Testavimo kultūra (sporų suspensija)*

- 5.5.1. 20 ml mitybinio agaro (5.1.1) steriliai įpilama į sterilią Petri lėkštelę (4.2.2) ir atšaldoma iki kambario temperatūros.

- 5.5.2. Sterilia pipete (4.2.4) įpilama 5 ml sterilaus distiliuoto vandens į mėgintuvėlį su pagrindine kultūra ir sporos nuplaunamos nuo nuožulniai sustingdinto agaro naudojantis sterilia kilpa. Ši sporų suspensija turi būti laikoma nuo 0° iki 5 °C temperatūroje ir turi būti naudojama neilgiau kaip 36 valandas.

- 5.5.3. Sterilia pipete (4.2.4) įpilama 0,5 ml sporų suspensijos (5.5.2) į lėkštelę su mitybine kultūra (5.5.1) ir pasėta kultūra kruopščiai išskaidoma per visą paviršių su išlenkta stikline lazdele. Inkubuoti 63 ± 1 °C (4.1.1) temperatūroje nuo 16 iki 18 valandų.

Naudojant pagrindinę kultūrą (5.4.2) arba senesnę kaip 36 valandų kultūrą, dukterinės kultūros gavimo procedūra turi būti atlikta mažiausiai du kartus, esant ne ilgesniam kaip 36 valandų laikotarpiui tarp dukterinių kultūrų gavimo.

- 5.5.4. Sterilia pipete (4.2.4) įpilama 10 ml distiliuoto vandens į lėkštelę su kultūra (5.5.3) ir naudojant išlenktą stiklinę lazdele sporos pašalinamos nuo paviršiaus į suspensiją.

Sporų suspensija supilama į butelį (4.2.3), kuriame yra 250 ml sterilaus distiliuoto vandens. Butelis uždaromas ir kruopščiai suplakamas. Kultūros, kurios nebus tuoj pat persėjamos, turi būti laikomos šaldytuve (0–6) °C temperatūroje.

- 5.5.5. Sporų suspensijoje gyvybingų kolonijų skaičius turi būti nuo 5 iki 10 milijonų 1 ml lėkštelėje esančio skaičiuojamo agaro terpės, kuri buvo inkubuota 63 ± 1 °C temperatūroje 16–18 valandų. Sporų suspensija turi būti vienodai drumsta, ir jeigu joje yra nuosėdos, ji turi būti išmesta ir turi būti paruošta nauja suspensija iš pagrindinės kultūros.

5.6. *Mėgintuvėlių arba ampulių paruošimas*

- 5.6.1. Agaro terpė (5.1.2) ištirpinama ir atšaldoma iki 55 °C temperatūros.

- 5.6.2. Viena dalis šviežios sporų suspensijos (5.5.4) sumaišoma su penkiomis agaro terpės dalimis, esančiomis mėgintuvėlyje ar butelyje (5.6.1), ir kruopščiai išmaišoma.

- 5.6.3. 0,3 ml terpės su sporomis (5.6.2), apskaičiavus, kad bus gautas 5 mm storio sluoksnis, įpilama į sterilų mėgintuvėlį ar ampulę (4.2.6) ir uždaroma kamščiu arba dangteliu, arba užlydant viršūnę. Mėgintuvėliams ar ampulėms leidžiama atvėsti vertikaliaje padėtyje, terpei leidžiama sukietėti ir tada paliekama stovėti ne trumpiau kaip 12 valandų.

- 5.6.4. Mėgintuvėliai ar ampulės gali būti naudojami tą pačią dieną, bet jie gali būti laikomi ir keletą mėnesių, su sąlyga, kad jie nuo paruošimo yra iš karto atšaldomi ir laikomi 0–6 °C temperatūroje.

6. **Procedūra**

- 6.1. Mėginiai turi būti tiriami kaip galima greičiau ir pageidautina per 24 valandas nuo mėginių paėmimo laikant, mėginius tuo metu nuo 0 iki 5 °C temperatūroje. Jei negalima mėginių ištirti per 24 valandas, jie turi būti laikomi giliai užšaldyti (–30 iki –15 °C), siekiant iki minimumo sumažinti penicilino inaktyvaciją.

- 6.2. Kiekvienas mėgintuvėlis ar ampulė (5.6) pažymimi įskaitomai ir neištrinamai. Nuimamas dangtelis ar kamštis. Į tinkamą stovėlį (4.1.3) sudedamas tyrimui reikalingas skaičius tiriamųjų ir kontrolinių mėginių mėgintuvėlių.
- 6.3. Į kiekvieną mėgintuvėlį ar ampulę įpilama 50 mikrolitrų 5.1.4 punkte nurodytų mitybinių medžiagų.
- 6.4. Pieno mėginys kruopščiai išmaišomas ir 0,1 ml įpilama švirkštu (4.1.4) į atitinkamai pažymėtą mėgintuvėlį ar ampulę. Kiekvienam mėginiui naudojamas švarus vienkartinio naudojimo antgaliukas.
- 6.5. 6.4 punkte aprašytas veiksmas pakartojamas du kartus, naudojant etaloninį penicilino tirpalą, kuriame vietoje pieno mėginio (5.2.3) yra naudojama 0,004 µg/ml (= 0,0067 TVml penicilino).
- 6.6. 6.4 punkte aprašytas veiksmas kartojamas du kartus, kontrolei panaudojant vietoje pieno mėginio inhibitorių neturintį pieną (5.3).
- 6.7. Mėgintuvėliai ar ampulės užkemšami ir stovėlis, kuriame laikomi mėgintuvėliai ar ampulės, įdedamas į vandens vonią, kurios temperatūra yra 63 ± 1 °C, (4.1.2) ir laikomas ne trumpiau kaip 2 val. arba nuo 2 iki 4 valandų.
- 6.8. Stovėlis su mėgintuvėliais ar ampulėmis išimamas iš vandens vonios.
- 6.9. Stebima terpės spalva (žr. 7).

7. Rezultatų aiškinimas

- 7.1. Jeigu visuose tiriamųjų ir kontrolinių mėginių mėgintuvėliuose ar ampulėse terpė nusidažo violetine spalva, tai rodo, kad mėginiuose yra antibiotikų arba sulfamidų ir jų kiekis yra toks, koks nurodytas lentelės 58 p. skylyje „visi teigiami“. Mėgintuvėlių ar ampulių su etaloniniu penicilino tirpalu (6.5) spalva turi būti violetinė, kad parodytų pakankamą tyrimų terpės jautrumą.
- 7.2. Jeigu violetine spalva nusidažo tik dalis tiriamųjų mėginių mėgintuvėlių ar ampulių terpės arba jei kai kurių iš jų terpė nusidažo netolygiai, inhibitorinių medžiagų kiekis mėginyje yra tarp lentelėje 39 punkte pateiktų verčių.
- 7.3. Jeigu kuriame nors iš tiriamųjų ar kontrolinių mėginių mėgintuvėlių ar ampulių testo terpė nusidažo geltona spalva, tai rodo, kad mėginyje nėra inhibitorinių medžiagų, stabdančių testo mikroorganizmo augimą.
- 7.4. Jeigu visuose tiriamuosiuose mėgintuvėliuose ar ampulėse, įskaitant ir neigiamąjį kontrolinį mėgintuvėlį yra purpurinė spalva, tai rodo, kad mėgintuvėliuose ar ampulėse nėra gyvybingų sporų, ir mėginiai turi būti iš naujo ištirti, naudojant šviežiai paruoštas tyrimų medžiagas.

8. Rezultatų patvirtinimas

- 8.1. Visi mėginiai patvirtinami reakcija, kaip aprašyta 7.1 ir 7.2 punktuose, naudojant „B metodą“.

Jeigu prieš patvirtinimą yra būtina pieno mėginius palaikyti, jie turi būti laikomi giliai užšaldyti, siekiant išvengti antibiotikų suskildimo.

B. Penicilinų patvirtinimo ir jų koncentracijos nustatymo procedūra

1. Taikymo sritis

Penicilinų aptikimo mėginyje patvirtinimo ir jų koncentracijos nustatymo metodas skirtas patvirtinti penicilinų ar kitų antibiotikų aptikimą pieno mėginiuose ir nustatyti penicilino koncentraciją pieno mėginiuose, kurių rezultatai kokybiniu metodu buvo įvertinti kaip teigiami (A.7.1) arba abejotini (A.7.2).

Įvairių antibiotikų jautrumas procedūrai

Žr. A.1.

2. Apibrėžimas

- 2.1. Pieno mėginyje yra antibiotikų, įskaitant sulfamidus, kai ištyrus pieno mėginį apibūdintu metodu, aplink diską susidaro aiški, ne mažiau kaip 2 mm inhibicijos zona.

- 2.2. Jeigu mėginys, kuriame yra antibiotikai, įskaitant sulfamidus (2.1), ir į kurį buvo įdėta penicilinazės (betalaktamazės), neturi aiškos zonos arba mažesnio skersmens aiškos zonos negu be penicilinazės, reiškia, kad yra inhibitorinės medžiagos, ir *tai yra arba penicilinas arba penicilinas kartu su kitomis antibiotinėmis medžiagomis, įskaitant sulfamidus.*

- 2.3. Jeigu zona nėra inaktyvuojama penicilinaze (2.2), inhibitorinė medžiaga pieno mėginyje *yra ne penicilinas*, bet gali būti *kitas likutis* (žr. Direktyva 85/397/EEB, A priedas, VI skyrius, A.1. f ir 2 b).

Kai kurie iš pusiau sintetinių penicilinų, pvz., natrio kloksacilinas, nėra inaktyvuojami arba yra tik dalinai inaktyvuojami penicilinaze arba yra visiškai atsparūs, ir todėl neatpažįstami kaip penicilinas (žr. 7.3).

3. Principas

Absorbcinio popieriaus diskas, sudrėkintas tiriamuoju pienu, yra padedamas ant agaro terpės su *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* sporomis paviršiaus. Inkubacijos metu normalus mikroorganizmų augimas iššaukia agaro drumstumą. Jeigu piene yra medžiagų, kurios trukdo mikroorganizmų augimą, jos yra nustatomos esant aiškiai zonai apie diską. Aiškos zonos dydis be kitų faktorių dar priklauso nuo piene esančių inhibitorinių medžiagų koncentracijos ir tipo.

4. Prietaisai, stikliniai indai ir įranga

4.1. Prietaisai

4.1.1 Žr. A.4.1.

4.1.2 Vandens vonia, palaikanti 80 ± 1 °C temperatūrą.

4.2. Stikliniai indai

Žr. A.4.2.

4.3. Popieriniai diskai be inhibitorių nuo 9 iki 13 mm skersmens, galintys vidutiniškai sugerti apie 130 mg pieno (pageidautina laikomi eksikatoriuje).

5. Terpė, etaloniniai tirpalai, penicilinazės tirpalai, reagentai, testavimo mikroorganizmai ir kt.

Terpės sudėtinės dalys turi būti tinkamos bakteriologiniams tikslams. Turi būti naudojamas distiliuotas ar demineralizuotas arba bent jau analogiško grynumo vanduo. Jame neturi būti medžiagų, kurios stabdytų testavimo mikroorganizmų augimą.

5.1. Terpė

5.1.1 Mitybinis agaras (A. 5.1.1)

5.1.2 Tyrimų terpė inhibitorinėms medžiagoms nustatyti.

Sudėtis

Mielių ekstrakto	2,5 g
Triptono	5 g
Gliukozės	1 g
Trimetoprino ar tetroksoprino tirpalo (A.5.1.3)	10 ml
Agaro	10–15 g (priklausomai nuo gelio kokybės)
Vandens	1 000 ml

Paruošimas

Prieš pridedant trimetoprino ar tetroksoprino į tirpalą, sausosios sudėtinės dalys yra visiškai ištirpinamos vandenyje kaitinant ir maišant. Pridėjus trimetoprino ar tetroksoprino tirpalo, pH turi būti sureguliuotas tokiu būdu, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $8,0 \pm 0,1$. Terpė yra sterilizuojama 15 minučių 121 ± 1 °C temperatūroje.

5.2. Etaloniniai penicilino tirpalai piene

Žr. A.5.2.

Norint nustatyti inhibitorinių medžiagų (8) kiekį, pagaminami šių koncentracijų etaloniniai penicilino tirpalai piene be inhibitorių (A.5.3):

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

5.3. *Penicilinazės tirpalas*

- 5.3.1. Pakankamas penicilinazės (betalaktamazės) kiekis ištirpinamas steriliame distiliuotame vandenyje, kad būtų 1 000 TV/ml koncentracija. Pageidautina, kad šis tirpalas būtų padalintas į mažas porcijas. Jis gali būti laikomas nuo 0 iki 5 °C temperatūroje iki keturių savaičių.

Pastaba

Nėra vieningo penicilinazės tarptautinio standarto. Yra priimta, kad šiame metode 10 vienetų penicilinazės pakanka inaktyvuoti 0,6 µg (= 1 TV) penicilino. Jeigu gaunamas penicilinazės aktyvumas yra nežinomas, tai būtina reikia patikrinti, ar galioja ši prielaida. Priešingu atveju, būtina atitinkamai pakeisti penicilinazės tirpalo koncentraciją.

- 5.3.2. Vietoje penicilinazės tirpalo gali būti naudojami komerciniu būdu gaunami diskai, paruošti su penicilinaze, jeigu, kontrolinės procedūros metu nustatoma, kad jie turi atitinkamą penicilinazės kiekį.

5.4. *Testavimo mikroorganizmas*

Žr. A.5.4.

5.5. *Testavimo kultūra (sporų suspensija)*

Žr. A.5.5.

5.6. *Petri lėkštelių paruošimas*

- 5.6.1. Siekiant nustatyti inhibitorines medžiagas (5.1.2), terpė ištirpinama ir atšaldoma iki 55 °C.
- 5.6.2. Į butelį įpilama viena šviežių sporų suspensijos (5.5) dalis tokiam terpės, skirtos inhibitorinių medžiagų (5.1.2) nustatymui, dalių skaičiui, kad pasėtoje terpėje būtų gautas atitinkamas kolonijų tankis. Kruopščiai sumaišoma.
- 5.6.3. Į prieš tai pakaitintą iki 55 °C temperatūros sterilią Petri lėkštelę (A.4.2.2) įpilama terpės su sporomis (5.6.2), kuri sudarytų nuo 0,6 iki 0,8 mm storio sluoksnį. Norint gauti 0,8 mm storio sluoksnį, Petri lėkštei, kuri yra 140 mm vidinio skersmens, reikia apie 15 ml terpės.
- 5.6.4. Petri lėkštelės pernešamos ant šalto, horizontalaus, prieš tai patikrinto su spirito gulsčiu, paviršiaus, nuimami dangteliai ir agaro terpei leidžiama sustingti. Kai terpė sustingsta, dangteliai vėl uždedami ant lėkštelių, kurios yra apverčiamos, siekiant kiek galima sumažinti kondensaciją ant agaro terpės paviršiaus.
- 5.6.5. Tokiu būdu paruoštas lėkštelės pageidautina naudoti tą pačią dieną, bet jos gali būti laikomos iki dviejų savaičių, su sąlyga, kad jos iš karto po paruošimo yra laikomos sandariame polietiliniame krepšyje 5 °C temperatūroje.
- 5.6.6. Norint atpažinti mėginius, paženklunami lėkštelės dugnai.

6. **Procedūra**

6.1. *Mėginio paruošimas*

- 6.1.1. Mėginiai, duodantys teigiamus ar abejotinus rezultatus „A metodo“ metu, (A.7.1 ir A.7.2 punktuose), turi būti iš naujo tiriami, identifikuojamas penicilinas ir nustatomas jo kiekis.
- 6.1.2. Iš pradžių šie pieno mėginiai yra 10 minučių kaitinami 80 ± 1 °C temperatūroje, siekiant išvengti termolabilių nespecifinių inhibitorių įtakos.
- 6.1.3. Kruopščiai išmaišius, 10 ml kaitinto tiriamojo pieno yra įpilama į tinkamą sterilų plačiakaktį butelį. Į pieną yra įpilama apie 0,4 ml penicilinazės tirpalo ir kruopščiai išmaišoma.

6.2. *Inhibitorių nustatymas*

- 6.2.1. Popieriaus diskas (4.3) naudojant porą švarių sausų pincetų panardinamas į pieno mėginį (6.1.2). Pieno likutis pašalinamas liečiant diską į mėginio butelio šoną. Diskas padedamas lygiai ant mėginio lėkštelės (5.6) ir atsargiai paspaudžiamas pincetais žemyn.
- 6.2.2. Paruošti diskai su skirtingais pieno mėginiais turi būti vienas nuo kito nemažesniu nei 20 mm atstumu ir nemažesniu nei 10 mm atstumu nuo krašto.
- 6.2.3. Siekiant patikrinti jautrumą, diskai (4.3) panardinti į etaloninį penicilino tirpalą (5.2) diskai (4.3) turi būti laisvai padedami tarp pieno mėginių diskų, kad jų skaičius sudarytų mažiausiai 2 % pieno mėginių diskų skaičiaus. Kiekvienam tyrimui turi būti naudojami mažiausiai penki standartiniai diskai.
- 6.2.4. Kada visi diskai yra laisvai padėti ant agaro terpės ir identifiukuoti, lėkštelės apverčiamos ir inkubuojamos 63 ± 1 °C temperatūroje 2 val., arba nuo 2,5 iki penkių valandų.
- 6.2.5. Po inkubacijos lėkštelės ištiriamos prieš tinkamą šviesos šaltinį, siekiant nustatyti aiškias inhibicijos zonas aplink popieriaus diską. Aiškos zonos išmatuojamos.
- 6.2.6. Zonos apie diskus su penicilino etaloniniu tirpalu (6.2.3) turi būti ne mažesnės kaip 2 mm.
- 6.2.7. Aiškos zonos apie diskus, kuriuose yra pieno mėginiai, esančios mažiausiai tokio pat dydžio arba didesnės nei nurodyta 6.2.6, rodo medžiagas, trukdančias testavimo mikroorganizmo augimą.

6.3. *Inhibitorinių medžiagų identifikavimas ir jų kiekio nustatymas*

- 6.3.1. 6.2.1 punkte aprašyta procedūra yra atliekama du kartus, naudojant pakaitinto pieno mėginį (6.1.2) ir mėginį, apdorotą penicilinaze (6.1.3). Vietoj penicilinizės įpylimo į 10 ml pieno mėginį (5.3.2), į šį mėginį gali būti panardintas ir padėtas ant lėkštelės paruoštas penicilinizės diskas.
- 6.3.2. 6.2.1 punkte aprašyta procedūra yra atliekama du kartus kiekvienam iš 5.2 a–d punktuose nurodytų etaloninių penicilino tirpalų.
- 6.3.3. Turi būti nustatyti pieno mėginio, penicilinizės kontrolės, taip pat ir etaloninio penicilino tirpalų aiškių inhibicijos zonų vidutiniai skersmenys.

7. **Rezultatų aiškinimas (žr. 2)**

- 7.1. Jeigu aplink diską su penicilinizės kontrole nėra aiškos zonos, bet yra aiški zona aplink diską su pieno mėginiu, kuri yra lygi ar didesnė nei zona aplink diską su etaloniniu penicilino tirpalu (5.2 a), inhibitorinės medžiagos, esančios pieno mėginyje, atitinka mažiausiai 0,004 µg/ml natrio – (kalio) – benzil – penicilino koncentraciją.
- 7.2. Jeigu aiškos zonos apie diską su penicilinaze vidutinis skersmuo yra lygus aiškos zonos apie diską su pieno mėginiu vidutiniam skersmeniui, tai pienas turi inhibitorines medžiagas, kurių negalima inaktyvuoti su šioje procedūroje panaudotomis penicilinizės koncentracijomis.
- 7.3. Jeigu aiškos zonos apie diską su penicilinaze vidutinis skersmuo yra mažesnis už aiškos zonos apie diską su pienu, kaitintu pagal 6.1.2 punkto nurodymus, vidutinį skersmenį, tai reikia, kad piene yra penicilinas kartu su kitais antibiotikais, įskaitant sulfamidus, be to, penicilinas ar pusiau sintetinis penicilinas, kurio negalima atpažinti šioje procedūroje naudojamos penicilinizės koncentracijos. Sintetiniai penicilinai tokie kaip natrio kloksacilinas šio tyrimo sąlygomis gali nebūti inaktyvuojami penicilinaze ir todėl gali būti klasifikuojami kaip kiti, išskyrus peniciliną, inhibitoriai.

Pastaba

Jei reikalinga, kitos, išskyrus peniciliną, inhibitorinės medžiagos gali būti identifikuojamos panaudojus atitinkamus metodus.

8. **Penicilino kiekio nustatymas**

- 8.1. Penicilino kiekį galima nustatyti nubrėžus standartinę kreivę arba paskaičiavus iš zonų dydžių, gautų naudojant etaloninius penicilino tirpalus piene (5.2 a–d punktai), vertes.

8.2. *Standartinės kreivės nubraižymas.*

Kadangi tarp penicilino koncentracijos $\log_{10}$ ir inhibitorinių zonų skersmens yra tiesinė koreliacija, standartinė kreivė gali būti nubrėžta ant pusiau logaritminio popieriaus, penicilino koncentracijas naudojant kaip logaritminę ordinatę, o inhibitorines zonas kaip abscisę. Inhibitorinės zonos yra paskaičiuojamos kaip dviejų vienodų tyrimų vidurkis. Inhibitorinių zonų skersmenys yra nubrėžiami standartinių penicilino koncentracijų atžvilgiu ir gaunama standartinė kreivė.

8.3. *Paskaičiavimas*

Pieno mėginyje esančio penicilino koncentracijos gali būti paskaičiuotos iš jų zonų skersmenų, naudojant lygtį ar standartinę kreivę. Norint tiksliau nustatyti tyrimo rezultatus, nustatyti inhibitorinių zonų spinduliai turi būti mažiausiai du kartus, bet ne daugiau kaip 5 kartus, didesni už diskų spindulius.

9. **Rezultatų išraiška**

9.1. Rezultatai yra išreiškiami nurodant penicilino kiekį, kuris yra lygus arba viršija 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (arba nurodant nustatytas koncentracijas) ar nurodant kitų, išskyrus peniciliną, inhibitorių kiekį.

9.2. *Rezultatų pakartojamumas (r) ir atkuriamumas (R)*

Skaičių nėra ir jie nereikšmingi, kadangi sulyginimui yra naudojamas etalonas.

IX. PATOGENINIŲ MIKROORGANIZMŲ NUSTATYMAS**1. Taikymo sritis**

Pagal Direktyvos 85/397/EEB A priedo VII (2) skyriaus reikalavimą, ši procedūra pateikia nurodymus, kurių privalu laikytis tikrinant pasterizuotame piene patogeninių mikroorganizmų buvimą.

2. Apibrėžimas

Turi būti ištirtos bakterijų rūšys, kurios dažniausiai yra susijusios su maisto sukeliama ligomis.

Pasterizacija yra pieno apdorojimas, apsaugantis jį nuo termiškai neatsparių patogenų. Kuomet yra įvykdyti šios direktyvos A priedo VII (2) skyriaus reikalavimai dėl kolonijų skaičiaus nustatymo 30 °C ir 21 °C temperatūrose, koliforminių bakterijų ir fosfatazės, specialus bandymas patogenams nustatyti yra būtinas tik tada, kai įtariama, jog pienas yra siejamas su apsinuodijimo maistu protrūkiu.

3. Procedūra

Procedūras ir tyrimo dažnumą turi nustatyti įgaliota valstybės institucija, tokiu būdu, kuris leistų išduoti termiškai apdorotam pienui, skirtam prekiauti Bendrijoje, nekenksmingumo sveikatai liudijimus. Nustatant patogeninius mikroorganizmus taikomi priimti tarptautiniai reikalavimai ir procedūros, jei tokios yra.

4. Rezultatų protokolai

Rezultatas kiekvienam ištirtam patogeniniam mikroorganizmui turi būti išreiškiamas šiuo būdu:

Skaičius, esantis pieno ml, arba „buvimas“ ar „nebuvo“ pasterizuoto pieno tūryje, reikalaujame priklauso nuo taikomo metodo. Protokole turi būti aiškiai aprašytas taikomas metodas.