|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ (ЕАСС)**  **EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION (EASC)** | | |
| Picture in Документ1 | **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ**  **СТАНДАРТ** | **ГОСТ**  *(проект,*  *первая редакция)* |

**МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ**

**Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ**

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Минск

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

20\_\_\_\_\_

**Предисловие**

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены [ГОСТ 1.0](http://docs.cntd.ru/document/1200128307) «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и [ГОСТ 1.2](http://docs.cntd.ru/document/1200128308) «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандартом)

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № от )

За принятие проголосовали:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Краткое наименование страны по МК(ИСО 3166) 004–97 | Код страны по МК(ИСО 3166) 004–97 | Сокращенное наименование  национального органа по стандартизации |
|  |  |  |
|  |  |  |

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 Подготовлен на основе ГОСТ Р 55481-2013

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

**МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ**

|  |
| --- |
| **МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ**  **Качественный метод определения остаточных количеств**  **антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических**  **веществ**  Meat and meat products.  Qualitative мethod for detection of antibiotics residues and other  antimicrobial chemotherapeutic agents |

Дата введения –

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на мясо всех видов убойных животных, мясо птицы, субпродукты, в том числе птичьи, и устанавливает качественный микробиологический метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 427 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5833 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7702.2.0 Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 10163 Реактивы. Крахмал растворимый. Технические условия

ГОСТ 11293 Желатин. Технические условия

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 21239 (ИСО 7741–86) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

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

ГОСТ 31502 Молоко и молочные продукты. Микробиологические методы определения наличия антибиотиков

ГОСТ 31598 (EN 285:1996) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

**3 Термины и определения**

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **антимикробное химиотерапевтическое вещество:** Вещество, использующееся для уничтожения возбудителей бактериальных заболеваний, находящихся в организме животного.

3.2 **антибиотик:** Биологически активное вещество микробного, животного, растительного происхождения (а также синтезированное), подавляющее жизнеспособность микроорганизмов.

**4 Сущность метода**

Метод основан на способности антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ подавлять рост тест-культуры в плотных питательных средах при рН (6,7 ± 0,1).

**5 Общие требования**

5.1 Общие требования проведения микробиологических исследований – по ГОСТ ISO 7218.

5.2 Требования к подготовке и тестированию питательных сред – по ГОСТ ISO 11133.

5.3 Требования безопасности при работе с микроорганизмами – по [1], с химическими реактивами – по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием – по ГОСТ 12.1.019, требования противопожарной безопасности – по ГОСТ 12.1.004.

**6 Средства измерений, вспомогательное оборудование,**

**материалы и реактивы**

Аппаратура, материалы и реактивы по ГОСТ ISO 7218 со следующими дополнениями:

ножницы по ГОСТ 21239;

пинцеты по ГОСТ 21241;

линейка по ГОСТ 427;

ротационный гомогенизатор (блендер);

pH-метр, имеющий точность калибровки ± 0,1 ед. pH при 25 °C;

центрифуга со скоростью вращения не менее 3000 об/мин;

термостат, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С;

термостат, обеспечивающий поддержание температуры (65 ± 1) °С;

стерилизатор паровой по ГОСТ 31598;

колбы плоскодонные различной вместимости по ГОСТ 25336;

дозаторы переменного объема;

наконечники к дозаторам;

пипетки градуированные вместимостью 10 см3 с ценой деления 0,1 см3 по ГОСТ 29227;

пипетки градуированные вместимостью 2 см3 с ценой деления 0,02 см3 по ГОСТ 29227;

пробирки различной вместимости по ГОСТ 25336;

пробирки центрифужные;

флаконы разной вместимости;

чашки Петри полимерные диаметром 90 мм.

пробочное сверло диаметром 9 мм;

лента воздухонепроницаемая эластичная;

агар микробиологический по ГОСТ 17206;

бромкрезоловый пурпурный, ч.д.а.;

вода дистиллированная по ГОСТ 6709;

глюкоза по ГОСТ 6038;

желатин пищевой по ГОСТ 11293;

крахмал растворимый по ГОСТ 10163;

натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.;

пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805;

сахароза по ГОСТ 5833;

стандарт мутности Мак-Фарланда по [2] или стандартные образцы мутности по [3];

стандартные образцы антибиотиков;

тест-культура: Bacillus stearothermophilus (Geobacillus stearothermophilus) BKM B-718 или Bacillus stearothermophilus (Geobacillus stearothermophilus) ATCC 79531);

тест-набор, включающий агаризованную питательную среду, суспензию спор Geobacillus stearothermophilus, индикатор бромкрезоловый пурпурный во флаконах по 12 или 120 см3, пробочное сверло2);

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования и посуды с техническими характеристиками не хуже, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

**7 Отбор и подготовка проб**

7.1 Отбор и подготовку проб проводят в соответствии ГОСТ ISO 7218, ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 31904 и ГОСТ 26669 с учетом нижеследующего.

7.2 С поверхности и глубины (суммарно) лабораторной пробы (без обжига поверхности), с помощью стерильных ножниц и пинцетов, отбирают пробу и измельчают на ротационном гомогенизаторе. Затем от нее отбирают анализируемую пробу массой не менее (25,0 ± 0,5) г и помещают в стерильный пакет для гомогенизации или в другую емкость по выбору лаборатории.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1) Депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов и в Американской коллекции типовых культур соответственно.

2) Например, тест-набор «Антибиотест». Данная информация является рекомендуемой, приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования тест-наборов других изготовителей, обеспечивающих требования настоящего стандарта.

В емкость с измельченной анализируемой пробой добавляют 25 см3 физиологического раствора и тщательно перемешивают, получая при этом исходную суспензию.

Затем емкость с исходной суспензией выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 90 мин, периодически тщательно перемешивая.

Часть исходной суспензии после термостатирования переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость отбирают в стерильные пробирки или эппиндорфы.

7.3 Транспортирование проб в лабораторию и их хранение – по ГОСТ ISO 7218.

Проба должна быть представительной, без повреждений и изменений при транспортировании и хранении. Допускается замораживание пробы.

**8 Подготовка к анализу**

**8.1 Приготовление физиологического раствора**

В колбе или флаконе растворяют 8,5 г хлористого натрия в 1000,0 см3 дистиллированной воды, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1)°С в течение 15 мин.

**8.2 Приготовление питательных сред**

**8.2.1 Плотная культуральная среда по Кундрату**

8.2.1.1 Основа среды

Состав основы среды, г:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | пептон …………………………………………………….……… | 17,0 |  |
|  | хлористый натрий ……………………………………………… | 3,0 |  |
|  | глюкоза ………………………………………………...………… | 3,0 |  |
|  | сахароза …………………………………….…………………… | 2,0 |  |
|  | крахмал ………………………………………………………..… | 3,0 |  |
|  | желатин ……………………………………………………..…… | 2,5 |  |
|  | бромкрезоловый пурпурный …………………………….…… | 0,016 |  |
|  | агар микробиологический ……………………………………. | 10,0 |  |
|  | дистиллированная вода ………………………………………. | 1000,0 см3 |  |

Компоненты или сухую готовую среду растворяют при нагревании в дистиллированной воде до полного расплавления агар-агара. Затем устанавливают рН среды таким образом, чтобы после стерилизации его значение было (6,7 ± 0,1) ед. рН при температуре 25 °С.

Разливают основу среды в колбы или флаконы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Срок годности питательной среды, разлитой в колбы или во флаконы в лаборатории, устанавливают согласно ГОСТ ISO 11133.

8.2.1.2 Получение спор тест-культуры Bacillus stearothermophilus АТСС 7953 или Bacillus stearothermophilus ВКМ B-718

Споры тест-культуры получают по ГОСТ 31502.

8.2.1.3 Приготовление суспензии спор Bacillus stearothermophilus АТСС 7953 или Bacillus stearothermophilus ВКМ В-7183

Из спор, полученных по 8.2.1.2, с помощью стандарта мутности Мак-Фарланда по [2] или стандартного образца мутности по [3] готовят суспензию, содержащую 5,0×107 – 5,0×108 спор в см3 (КОЕ/см3).

П р и м е ч а н и е – Допускается использование готовой суспензии спор.

8.2.1.4 Готовая среда

Состав готовой среды приведен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Наименование компонента | Объем, см3 | Концентрация, КОЕ/см3 |
| Основа среды | 100,0 | - |
| Суспензия спор | 1,0 | 5,0×107 – 5,0×108 |

В основу питательной среды, приготовленной по 8.2.1.1 и охлажденной на водяной бане до температуры (55 ± 5) °С, добавляют суспензию спор, приготовленную по 8.2.1.3, и тщательно перемешивают.

8.2.1.5 Подготовка чашек Петри с плотной культуральной средой

Готовую среду по 8.2.1.4 разливают с помощью пипетки в стерильные полимерные чашки Петри по (11 ± 1) см3 и дают агару затвердеть.

Чашки с застывшей средой используют немедленно или заклеивают воздухонепроницаемой эластичной лентой.

Срок хранения чашек Петри со средой при температуре (5 ± 3) °С – не более одного месяца.

8.2.2 Тест-набор

Содержимое флакона растапливают на водяной бане, затем охлаждают только при комнатной температуре и сразу разливают в чашки Петри согласно 8.2.1.5.

Срок хранения чашек Петри со средой при температуре (5 ± 3 ) °С – не более одного месяца.

**8.3 Контроль качества среды**

8.3.1 Контроль качества основы готовой среды

8.3.1.1 Оценка производительности основы готовой среды

Оценку производительности основы готовой среды по 8.2.1.1 проводят качественным методом с учетом наличия роста тест-культуры Bacillus stearothermophilus. Интенсивность роста в слое агара после инкубации оценивают следующим образом:

0 – соответствует нулевому росту;

1 –слабому росту (либо сокращению роста или размеров колоний);

2 – выраженному росту.

Рост тест-культуры должен соответствовать уровню 2 и иметь характерный внешний вид, размеры и морфологию колоний.

8.3.1.2 Определение физических и химических показателей основы готовой среды

Оценка качества, проводимая визуально, должна гарантировать, что питательная среда соответствует установленным рекомендациям, например:

- внешний вид основы среды – плотная;

- цвет основы среды – синий;

- однородность основы среды – однородная, прозрачная;

- рН основы готовой среды (6,7 ± 0,1).

8.3.2 Контроль качества готовой среды

Необходимо контролировать качество каждой партии готовой среды.

8.3.2.1 Определение физических показателей готовой среды в чашках Петри

Оценка качества, проводимая визуально, должна гарантировать, что питательная среда соответствует установленным рекомендациям, например:

- объем наполнения чашек Петри готовой средой – (11 ± 1) см3;

- внешний вид готовой среды в чашках Петри – плотная;

- цвет готовой среды в чашках Петри – синий;

- однородность готовой среды в чашках Петри – однородная, прозрачная;

8.3.2.2 Оценка эффективности готовой среды в чашках Петри

Оценку эффективности готовой среды в чашках Петри проводят с одним из стандартных образцов антибиотиков.

**9 Проведение анализа**

С помощью пробочного сверла в среде, приготовленной по 8.2.1.5, вырезают лунки. Допускается на одной чашке Петри вырезать от двух до семи лунок. С наружной части чашки Петри контур лунки обводят тонким маркером.

Надосадочную жидкость одной пробы, полученной по 7.2, вносят параллельно в две лунки с помощью дозатора переменного объема по 0,05 см3.

Чашки Петри с исследуемым материалом выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин для диффузии надосадочной жидкости в агар, затем инкубируют в термостате при температуре (65 ± 1) °С не менее 4 ч крышками вверх до изменения цвета среды с синего на желтый.

П р и м е ч а н и е – Не допускается ставить чашки друг на друга.

**10 Обработка результатов**

Обработку результатов проводят сразу после окончания инкубирования.

С помощью линейки измеряют ширину зоны отсутствия роста тест-культуры в питательном агаре, начиная от края лунки (от контура лунки), просматривая чашки Петри в проходящем свете.

Отсутствие роста тест-культуры в зоне шириной равной или более 2,0 мм оценивают как положительный результат, т.е. как наличие антибиотиков или других антимикробных химиотерапевтических веществ в анализируемой пробе.

Наличие роста тест-культуры с изменением цвета питательной среды с синего на желтый или отсутствие роста тест-культуры в зоне шириной менее 2,0 мм оценивают как отрицательный результат, т.е. как отсутствие антибиотиков или других антимикробных химиотерапевтических веществ в анализируемой пробе.

**11 Оформление протокола испытания**

Протокол испытания должен содержать:

- информацию, необходимую для полной идентификации образца;

- метод определения со ссылкой на настоящий стандарт;

- полученные результаты;

- все подробности проведения испытания, не предусмотренные настоящим стандартом или считающиеся необязательными, но которые могут повлиять на результат.

Результат испытания записывают следующим образом: «В исследованном образце не обнаружены антибиотики и другие антимикробные химиотерапевтические вещества» или «В исследованном образце обнаружены антибиотики или другие антимикробные химиотерапевтические вещества».

## Приложение А

## (справочное)

**Пределы обнаружения антибиотиков**

А.1 Пределы обнаружения некоторых антибиотиков приведены в таблице А.1.

Т а б л и ц а А.1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Группа антибиотиков | Наименование  антибиотиков | Предел обнаружения,  мг/кг |
| Аминогликозиды | Гентамицин | 0,05 |
| Канамицин | 1,0 |
| Неомицин | 0,5 |
| Паромомицин | 0,5 |
| Стрептомицин | 0,5 |
| Спектиномицин | 0,4 |
| Пенициллины | Амоксициллин | 0,05 |
| Ампициллин | 0,05 |
| Бензилпенициллин | 0,05 |
| Диклоксациллин | 0,3 |
| Клоксациллин | 0,3 |
| Нафциллин | 0,3 |
| Оксациллин | 0,3 |
| Тетрациклиновая группа | Доксициклин | 0,1 |
| Окситетрациклин | 0,1 |
| Тетрациклин | 0,1 |
| Хлортетрациклин | 0,1 |
| Цефалоспорины | Цефалексин | 0,2 |
| Цефапирин | 0,05 |
| Цефкином | 0,05 |
| Хинолоны | Данофлоксацин | 4,0 |
| Дифлоксацин | 4,0 |
| Марбофлоксацин | 3,0 |
| Ципрофлоксацин | 2,0 |
| Флорфениколы | Флорфеникол | 20,0 |
| Линкозамиды | Линкомицин | 0,1 |
| Макролиды | Спирамицин | 20,0 |
| Тилозин | 0,2 |
| Тилмикозин | 5,0 |
| Плевромутилины | Вальнемулин | 0,5 |
| Тиамулин | 10,0 |
| Амфениколы | Тиамфеникол | 5,0 |
| Полимиксины | Колистин | 15,0 |
| Производные диаминопиримидина | Триметоприм | 0,2 |
| Нитрофураны | Фуразолидон | 0,1 |
| Полипептиды | Бацитрацин | 3,0 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |

**Библиография**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [1] | Санитарные правила  СП 1.3.2322-08 | Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней |
| [2] | Стандарт мутности Мак-Фарланда. Регистрационное удостоверение  № ФС № 2006/1177, зарегистрированное Росздравнадзором 01.08.2006 г. | |
| [3] | ОСО 42-28-85-10  ОСО 42-28-86-10 | Отраслевые стандартные образцы мутности, утвержденные ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

УДК 637.5.075:615.33:006.354 МКС 67.120.20

Ключевые слова: мясо, мясо птицы, субпродукты, антибиотики, антимикробные химиотерапевтические вещества

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Разработчики стандарта:

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

Врио директора О.А. Кузнецова

Заместитель директора

по научной работе А.А. Семенова

Руководитель отдела «Технического

регулирования и систем управления

качеством» З.А. Юрчак

Руководитель лаборатории Ю.К. Юшина

Ведущий научный сотрудник Д.С. Батаева

Младший научный сотрудник Е.В. Зайко