

Οι σωλήνες Durham δεν πρέπει να περιέχουν φυσαλίδες αέρα μετά την αποστείρωση.

Ελέγχεται το pH του υποστρώματος.

Εάν το υπόστρωμα δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία μεταξύ 0 και 5 °C επί όχι περισσότερο από ένα μήνα από την παρασκευή.

5.3. Αφυδατωμένα υποστρώματα καλλιέργειας του εμπορίου

Τα υποστρώματα καλλιέργειας (5.1, 5.2) μπορούν να παρασκευαστούν από αφυδατωμένα υποστρώματα του εμπορίου. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή. Το pH διορθώνεται και τα υποστρώματα διανέμονται, βράζονται ή αποστειρώνονται και διατηρούνται όπως περιγράφηκε στα σημεία 5.1 και 5.2.

6. Διαδικασία

6.1. Το υπόστρωμα

Χρησιμοποιείται το υπόστρωμα (άγαρ VRBL) όπως περιγράφηκε στο σημείο 5.1.

6.2. Προετοιμασία του δείγματος του γάλακτος

Το δείγμα του γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να κατανεμηθούν κατά το δυνατόν ομοιόμορφα, αναστρέφοντας γρήγορα το δοχείο με το δείγμα γάλακτος 25 φορές. Πρέπει να αποφεύγεται ο αφρισμός ή ο αφρός να αφήνεται να διαλυθεί. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της ανάμειξης και ανάληψης της δοκιμαστικής δόσης πρέπει να μην υπερβαίνει τα τρία λεπτά.

6.3. Εμβολιασμός τρυβλίων Petri

Εμβολιάζονται 3 ml του δείγματος γάλακτος (6.2) μεταφέροντας, με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3), 1 ml του δείγματος γάλακτος μέσα σε καθένα από τα τρία τρυβλία (4.2.4).

6.4. Εκχύση

Το άγαρ VRBL (6.1) εκχύεται σε κάθε εμβολιασμένο τρυβλίο σε ποσότητα 12 ml περίπου.

Αναμειγνύεται αμέσως μετά την ανάμειξη με περιστροφή του τρυβλίου Petri επαρκώς ώστε να προκύψουν ομοιόμορφα κατανεμημένες αποικίες μετά την επώαση.

Ο χρόνος μεταξύ του τέλους της προετοιμασίας του δείγματος γάλακτος και της ανάμειξης της δοκιμαστικής δόσης με το υπόστρωμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 15 λεπτά.

Προετοιμάζεται ένα μη εμβολιασμένο τρυβλίο με σκοπό τον έλεγχο της αποστείρωσης, με 12 ml από το άγαρ VRBL που χρησιμοποιείται για τα επωασμένα τρυβλία.

Αφήνονται να στερεοποιηθούν πάνω σε καθαρή, ψυχρή, οριζόντια επιφάνεια έως ότου το υπόστρωμα κατακαθίσει.

Μετά την πλήρη στερεοποίηση, εκχύνονται τουλάχιστον 4 ml άγαρ VRBL (6.1) πάνω στην επιφάνεια του ενοφθαλμισμένου υποστρώματος.

Αφήνονται να στερεοποιηθούν.

6.5. Επώαση των τρυβλίων Petri

Τα τρυβλία μεταφέρονται στον επωαστή (4.1.3). Τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα. Δεν στοιβάζονται περισσότερα από έξι κατά ύψος. Οι στιβάδες

των τρυβλίων πρέπει να απέχουν μεταξύ τους και από τα τοιχώματα και την κορυφή του επωαστήρα.

Επωάζονται στους 30 ± 1 °C επί 24 ± 2 ώρες .

6.6. Καταμέτρηση αποικιών

6.6.1. Οι αποικίες καταμετρούνται στα τρυβλία Petri που δεν περιέχουν περισσότερες από 150 αποικίες. Καταμετρώνται οι αποικίες με χρώμα σκούρο ερυθρό και διάμετρο τουλάχιστον 0,5 mm με ή χωρίς περιβάλλον ίζημα, χαρακτηριστικό για κολοβακτηρίδια

6.6.2. Εάν όλες ή μερικές αποικίες έχουν μη χαρακτηριστική εμφάνιση (π.χ. διαφέρουν σε χρώμα, μέγεθος ή το σχηματισμό ιζήματος από τυπικές αποικίες) εκτελείται δοκιμή επιβεβαίωσης (6.7).

6.7. Δοκιμή επιβεβαίωσης

Σύμφωνα με τις ενδείξεις που δόθηκαν στο σημείο 6.6.2 εκτελείται μια δοκιμή επιβεβαίωσης σε κατάλληλο αριθμό (π.χ . 3 έως 5) μη χαρακτηριστικών αποικιών με εμβολιασμό λαμπρού πράσινου ζωμού λακτόζης-χολής (5.2) μέσα σε σωλήνες χρησιμοποιώντας συρμάτινη βελόνα (4.1.6). Οι σωλήνες επωάζονται στους 30 ± 1 °C επί 24 ± 2 ώρες.

Οι αποικίες που παράγουν αέριο στο σωλήνα Durham θεωρούνται επιβεβαιωμένες αποικίες κολοβακτηριδίων.

7. Υπολογισμός και έκφραση αποτελεσμάτων

7.1. Χρησιμοποιούνται μετρήσεις (βλέπε σημείο 7.4) από τρυβλία που δεν περιέχουν περισσότερες από 150 αποικίες.

7.2. Εάν εκτελεστεί δοκιμή επιβεβαίωσης, ο αριθμός αποικιών κολοβακτηριδίων επιβεβαιώνεται από το ποσοστό επιβεβαιωμένων αποικιών κολοβακτηριδίων.

- 7.3. Ο αριθμός των κολοβακτηριδίων ανά ml παστεριωμένου γάλακτος δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{\Sigma C}{\eta}$$

$$\eta$$

όπου:

ΣC = είναι ο ολικός αριθμός αποικιών κολοβακτηριδίων (σημείο 7.1 σε συνδυασμό με το σημείο 7.2) που βρέθηκαν με την εξέταση του δείγματος γάλακτος (3 ml).

η = είναι ο αριθμός των ml του εξετασθέντος δείγματος (6.3) (3 ml).

Η μέτρηση δίνεται με ακρίβεια δύο σημαντικών ψηφίων όταν πρόκειται για περισσότερες από 100 αποικίες. Όταν το ψηφίο που πρέπει να στρογγυλοποιηθεί είναι 5, στρογγυλοποιείται έτσι ώστε το ψηφίο που παραμένει αριστερά του να είναι ζυγός αριθμός.

Εάν υπάρχουν μόνο μετρήσεις υπερβαίνουσες τις 150 αποικίες, το αποτέλεσμα αναφέρεται ως ο "Εκτιμώμενος αριθμός κολοβακτηριδίων ανά ml".

8. Ακρίβεια

Δεν υπάρχουν αποτελέσματα διεθνώς αναγνωρισμένων δοκιμών συνεργασίας.

VII . ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέθοδος αυτή καθορίζει δύο μεθόδους ως διαδικασίες αναφοράς καταμέτρησης σωματικών κυττάρων:

A . Τη μικροσκοπική μέθοδο

B . Τη φθοριο-οπτικο-ηλεκτρονική μέθοδο

A . Μικροσκοπική μέθοδος

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η διαδικασία αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς καταμέτρησης σωματικών κυττάρων σε ακατέργαστο γάλα.

Η διαδικασία αυτή καθορίζει τη διαδικασία καταμέτρησης του αριθμού των κυττάρων σε δείγμα γάλακτος για να βαθμονομηθεί και ελεγχθεί η ακρίβεια της φθοριο-οπτικο-ηλεκτρονικής μεθόδου (βλέπε σημείο B.1).

2. Ορισμός

Για τη διαδικασία αυτή σωματικά κύτταρα είναι εκείνα τα κύτταρα, π.χ . λευκοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα των οποίων οι πυρήνες χρωματίζονται χαρακτηριστικά με κυανό του μεθυλίου.

3. Αρχή

0,01 ml γάλακτος απλώνονται πάνω σε 1 cm² μιας πλάκας. Ο υμένας ξηραίνεται και χρωματίζεται. Η καταμέτρηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων που καταμετρήθηκε σε μια ορισμένη περιοχή πολλαπλασιάζεται επί τον πειραματικό συντελεστή για να δώσει τον αριθμό κυττάρων ανά ml.

4. Αντιδραστήρια

Πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικά αναλυτικού βαθμού.

Διάλυμα χρωστικής

Σύσταση:

Κυανό μεθυλενίου	0,6 g
Αιθανόλη - 99 %	54 ml
1,1,1-τριχλωροαιθάνιο ή τετραχλωροαιθάνιο	40 ml
Παγωμένο οξεικό οξύ	6 ml

Προειδοποίηση

Το τετραχλωροαιθάνιο είναι δηλητηριώδες. Εάν χρησιμοποιηθεί, η παρασκευή και ο χειρισμός πρέπει να γίνουν σε απαγωγό εστία.

Παρασκευή:

Αναμειγνύονται η αιθανόλη και το 1, 1, 1-τριχλωροαιθάνιο ή τετραχλωροαιθάνιο σε φιάλη και θερμαίνονται σε υδρόλουτρο στους 60-70 °C. Προστίθεται το κυανό του μεθυλενίου, αναμειγνύονται προσεκτικά, ψύχονται σε ψυγείο στους 4 °C επί 12 έως 24 ώρες και προστίθεται το παγωμένο οξεικό οξύ. Διηθούνται, χρησιμοποιώντας ηθμό με πόρους μεγέθους 10 έως 12 μικρών το λιγότερο, και το διάλυμα της χρωστικής φυλάσσεται σε αεροστεγή φιάλη. Εάν σχηματιστούν σωματίδια ή ίζημα, επαναδιηθείται πριν από τη χρήση.

5. Όργανα και γυάλινα σκεύη
 - 5.1. Μικροσκόπιο, μεγεθυντικής ικανότητας x 500 έως x 1 000.
 - 5.2. Μικροσύριγγα, 0,01 ml, ακριβείας $\pm 2\%$ ή καλύτερης.
 - 5.3. Πλάκα, με σημειωμένη περιοχή 20 mm x 5 mm για τον υμένα, ή τυποποιημένη πλάκα και πλακέτα 20 mm x 5 mm για τον υμένα.
 - 5.4. Επίπεδη θερμαινόμενη πλάκα, (30-50 °C) για ξήρανση του υμένα:
 - 5.6. Υδρόλουτρο, ικανό να λειτουργεί στους 30-40 °C για θέρμανση του δείγματος γάλακτος.
 - 5.7. Μικρομετρικός κανόνας, βαθμονομημένος, σε υποδιαιρέσεις των 0,01 mm.
6. Διαδικασία

- 6.1. Δείγμα γάλακτος

Το δείγμα του γάλακτος πρέπει να εξετάζεται μέσα σε έξι ώρες από τη δειγματοληψία. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 6 °C. Πρέπει να αποφεύγεται η κατάψυξη.

- 6.2. Προετοιμασία του δείγματος στο εργαστήριο

Το δείγμα θερμαίνεται σε υδρόλουτρο (5.6) στους 30-40 °C . Κατόπιν αναμειγνύεται προσεκτικά. Ψύχεται στην θερμοκρασία στην οποία η μικροσύριγγα (5.2) έχει βαθμονομηθεί, π.χ . 20 °C.

- 6.3. Προεπεξεργασία των πλακών

Οι πλάκες (5.3) καθαρίζονται, για παράδειγμα με αιθανόλη, στεγνώνονται με

χαρτί απηλλαγμένο σκόνης, περνούν πάνω από φλόγα και ψύχονται. Φυλάσσονται σε δοχείο για να προφυλαχθούν από σκόνη.

6.4. Παρασκευή του υμένα

Αναλαμβάνονται 0,01 ml γάλακτος από το δείγμα που προετοιμάστηκε κατά τα ανωτέρω, χρησιμοποιώντας μικροσύριγγα (5.2). Καθαρίζεται προσεκτικά το εξωτερικό μέρος της σύριγγας που ήρθε σε επαφή με γάλα. Η σύριγγα τοποθετείται πάνω στην πλάκα (5.3), πρώτα ακολουθώντας τον περίγυρο του σχήματος (20 mm x 5 mm). Μετά γεμίζεται η επιφάνεια εσωτερικά, κατά το δυνατόν ομοιόμορφα. Ο υμένας ξηραίνεται πάνω σε επίπεδη θερμαινόμενη πλάκα (5.4) έως ότου ξηραθεί εντελώς.

Πρέπει να παρασκευαστούν και εξεταστούν τουλάχιστον δύο υμένες από κάθε δείγμα γάλακτος.

6.5. Χρωματισμός των υμένων

Βυθίζονται στο διάλυμα χρωστικής (4) επί δέκα λεπτά. Ξηραίνονται, εάν χρειαστεί, συμπληρωματικά με ανεμιστήρα (5.5). Οι υμένες βυθίζονται σε νερό της βρύσης έως ότου όλη η επιπλέον χρωστική ξεπλυθεί. Μετά ξηραίνονται ξανά και φυλάσσονται προφυλαγμένοι από τη σκόνη.

6.6. Βαθμονόμηση του μικροσκοπικού πεδίου

Η διάμετρος του μικροσκοπικού πεδίου προσδιορίζεται με τη βοήθεια του μικρομετρικού κανόνα (5.7) ανάλογα με την επιλεγόμενη μεγέθυνση (x 500 -x 1 000).

7. Καταμέτρηση και υπολογισμός

7.1. Καταμέτρηση κυττάρων

Χρησιμοποιείται μικροσκόπιο (5.1). Αντί να καταμετρηθούν κύτταρα, καταμετρώνται μόνο πυρήνες κυττάρων. Αυτοί είναι ευκρινώς αναγνωρίσιμοι και για την καταμέτρηση πρέπει τουλάχιστον ο μισός πυρήνας να είναι ορατός στο μικροσκοπικό πεδίο. Καταμετρώνται λωρίδες ή περιοχές κατά μήκος του μεσαίου τρίτου του υμένα, αποφεύγεται η καταμέτρηση λωρίδων ή περιοχών επιλεγμένων αποκλειστικά από τις περιφερειακές περιοχές του υμένα. Η προσεκτική παρασκευή των υμένων και, επομένως η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον μια φορά το μήνα, καταμετρώντας διαφορετικά τμήματα του υμένα. Η καταμέτρηση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί καταμετρώντας μικροσκοπικά πεδία σε τέτοια κατανομή ώστε όλα τα τμήματα του υμένα να αντιπροσωπεύονται ισοδύναμα.

7.2. Ελάχιστος αριθμός κυττάρων προς καταμέτρηση

Αφού η μικροσκοπική καταμέτρηση σωματικών κυττάρων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τυποποίηση αυτοματοποιημένων και μηχανοποιημένων διαδικασιών καταμέτρησης, ο συντελεστής διακύμανσης μετρήσεων ταυτόσημων δειγμάτων δεν πρέπει να είναι υψηλότερος από αυτόν των ηλεκτρονικών οργάνων. Ο συντελεστής διακύμανσης για δείγμα γάλακτος περιέχοντος 400 000 έως 600 000 κύτταρα/ml δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 %.

Ο αριθμός σωματικών κυττάρων προς καταμέτρηση σε κάθε δείγμα πρέπει, σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της κατανομής Poisson, να είναι τουλάχιστον 400, για να επιτυγχάνεται η επαναληψιμότητα αυτή.

Η κατανομή Poisson προϋποθέτει :

$$M = V = S^2,$$

όπου

M είναι η μέση αριθμητική τιμή,

V είναι η διακύμανση

και

s είναι η τυπική απόκλιση.

Ο συντελεστής διακύμανσης είναι :

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

Το M (μέσος όρος) υποδηλώνει τον αριθμό των σωματιδίων (κυττάρων) που έχουν καταμετρηθεί (π.χ . 400 για CV = 5 %).

7.3. Υπολογισμός του πειραματικού συντελεστή

Ο πειραματικός συντελεστής υπολογίζεται χρησιμοποιώντας 0,01 ml γάλακτος σύμφωνα με τα σημεία 7.3.1 ή 7.3.2.

7.3.1 Καταμέτρηση λωρίδων κατά μήκος του υμένα

Το μήκος των λωρίδων προς καταμέτρηση είναι 5 mm η καθεμία. Το πλάτος μιας λωρίδας αντιστοιχεί στη διάμετρο του μικροσκοπικού πεδίου όπως προσδιορίστηκε με το μικρομετρικό κανόνα (5.7).

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

όπου:

d = είναι η διάμετρος του μικροσκοπικού πεδίου σε mm όπως προσδιορίστηκε με τον μικρομετρικό κανόνα (5.7),

b= είναι ο αριθμός των λωρίδων που έχουν πλήρως καταμετρηθεί .

7.3.2. Καταμέτρηση μικροσκοπικών πεδίων στο μεσαίο τρίτο του υμένα ή με πλέγμα

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

όπου:

d = είναι η διάμετρος του μικροσκοπικού πεδίου σε mm όπως προσδιορίστηκε με τον μικρομετρικό κανόνα (5.7),

s= είναι ο αριθμός των πεδίων που μετρήθηκαν .

7.4. Υπολογισμός της περιεκτικότητας κυττάρων

Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων που μετρήθηκαν (7.1 και 7.2) πολλαπλασιάζεται επί το πειραματικό συντελεστή (7.3), για να δώσει τον αριθμό κυττάρων ανά ml γάλακτος.

7.5. Ακρίβεια

Ο συντελεστής διακύμανσης (7.2) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 %.

Δεν υπάρχουν αποτελέσματα από διεθνώς αναγνωρισμένες δοκιμές συνεργασίας όσον αφορά την ακρίβεια.

B . Φθοριο-οπτικο-ηλεκτρονική μέθοδος

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η διαδικασία αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς, η οποία μετά από ορθή βαθμονόμηση (βλέπε Α.1), μπορεί να χρησιμοποιηθεί προς καταμέτρηση σωματικών κυττάρων σε ακατέργαστο γάλα - με ή χωρίς χημική διατήρηση.

2. Ορισμός

Για τη διαδικασία αυτή, σωματικά κύτταρα είναι κύτταρα με μια ελάχιστη ένταση φθορισμού οφειλόμενη στη χρώση του DNA του πυρήνα των σωματικών κυττάρων.

3. Αρχή

Ενα μέρος του δείγματος (π.χ . 0,2 ml) αναμειγνύεται πλήρως με ρυθμιστικό διάλυμα και διάλυμα φθορισμού . Μέρος του μείγματος αυτού μεταφέρεται μετά στη μορφή λεπτού υμένα σε περιφερόμενο δίσκο που χρησιμεύει ως αντικειμενικό πεδίο του μικροσκοπίου.

Κάθε κύτταρο παράγει ένα ηλεκτρικό παλμό ο οποίος ενισχύεται και καταγράφεται. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων εκτυπώνεται σε χιλιάδες ανά ml.

4. Αντιδραστήρια

Πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικά αναλυτικού βαθμού, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά. Το νερό πρέπει να είναι είτε απεσταγμένο είτε απιονισμένο είτε ισοδύναμης καθαρότητας.

4.1. Ρυθμιστικό διάλυμα

Σύσταση:

4513

Υδροφθαλικό κάλιο	51,0 g
Υδροξειδίο καλίου	13,75 g
Πολυαιθυλενογλυκολο-μονο-π (1,1,3,3-τετραμεθυλοβουτυλο)-φαινυλαιθέρας (π.χ . triton X-100), 1 % κατά όγκο	10 ml

pH 5,7-5.9. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό έως τα 10 000 ml.

Παρασκευή:

Αναμειγνύονται τα ανεξάρτητα συστατικά. Η αεροστεγής φύλαξη δεν πρέπει να υπερβαίνει τις επτά ημέρες.

4.2. Διάλυμα φθορισμού (μητρικό διάλυμα)

Σύσταση:

Βρωμιούχο αιθίδιο	1,0 g
-------------------	-------

Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό έως τα 1 000 ml

Παρασκευή:

Διαλύεται βρωμιούχο εθίδιο σε νερό. Η φύλαξη σε αδιαφανή και αεροστεγή φιάλη δεν πρέπει να υπερβαίνει τους δύο μήνες.

4.3. Διάλυμα φθορισμού (διάλυμα εργασίας)

Αναμειγνύονται 20 ml μητρικού διαλύματος (4.2) με το ρυθμιστικό διάλυμα

(4.1) για να δώσουν 1 000 ml. Το διάλυμα εργασίας δεν πρέπει να χρησιμοποιείται επί περισσότερο από επτά ημέρες.

4.4. Διάλυμα καθαρισμού

Σύσταση:

Ρυθμιστικό διάλυμα (4.1)	10 ml
Πολυαιθυλενογλυκολο-μονο-π-(1,1,3,3-τετραμεθυλβουτυλ)-φαινυλαιθέρας (π.χ . triton X-100), 1 % κατά όγκο	10 ml
Αμμωνία, 25 % κατά όγκο	25 ml

Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό έως τα 10 000 ml

Παρασκευή:

Αναμειγνύονται τα ανεξάρτητα συστατικά . Η φύλαξη δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 30 ημέρες .

5. Όργανα και γυάλινα σκεύη

5.1. Όργανο μέτρησης, που λειτουργεί με βάση την οπτική αρχή του φθορισμού.

Σημείωση

Το όργανο πρέπει να βαθμονομηθεί πριν από τη χρήση . Προσδιορίζεται έτσι η σχέση μεταξύ του όγκου των σωματιδίων προς καταμέτρηση και του κατώτερου ορίου πάνω από το οποίο γίνονται οι μετρήσεις. Η βαθμονόμηση της συσκευής γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

χρησιμοποιώντας δείγματα των οποίων η περιεκτικότητα κυττάρων έχει προσδιοριστεί με τη μικροσκοπική μέθοδο (Α).

- 5.2. Υδρόλουτρο, με κυκλοφορητή, ικανό να λειτουργεί στους 40 ± 1 °C.
- 5.3. Δοκιμαστικός σωλήνας, με κατάλληλο κλείσιμο, των 15 ml περίπου.

6. Δείγμα γάλακτος

- 6.1. Το δείγμα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία σε δοκιμαστικό σωλήνα (5.3). Εάν το δείγμα δεν έχει συντηρηθεί χημικά, δεν πρέπει να καταμετράται μέσα στις πρώτες 24 ώρες από την άλμεξη, επειδή οι μετρήσεις θα είναι υπερβολικά χαμηλές. Η θερμοκρασία διατήρησης δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 6 °C.

6.2. Συντήρηση

Η χημική συντήρηση πρέπει να πραγματοποιείται μέσα σε 24 ώρες. Η συντήρηση πρέπει να πραγματοποιείται κατά το δυνατόν συντομότερα μετά τη δειγματοληψία.

- 6.2.1. Η χημική συντήρηση του δείγματος μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη ενός από τα ακόλουθα συντηρητικά:

- ορθοβορικό οξύ:

η τελική συγκέντρωση του ορθοβορικού οξέος στο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,6 g/100 ml. Ένα έτσι συντηρημένο δείγμα μπορεί να διατηρηθεί επί 24 ώρες ακόμα στους 6-12 °C,

- διχρωμικό κάλιο:

η τελική συγκέντρωση του διχρωμικού κάλιου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα

0,2 g/100 ml . Δείγματα συντηρημένα έτσι μπορούν να διατηρηθούν επί 72 ώρες ακόμα στους 6-12 °C,

- αζίδιο νατρίου:

τα δείγματα μπορούν να συντηρηθούν με αζίδιο νατρίου σε τελική συγκέντρωση 0,024 g/100 ml, εφόσον το δείγμα ψυχθεί στους 6-12 °C αμέσως μετά τη δειγματοληψία και μετρηθούν μέσα σε 48 ώρες από τη δειγματοληψία,

- βροποροί:

το δείγμα μπορεί να διατηρηθεί με βροποροί σε τελική συγκέντρωση 0,05 g/100 ml, εφόσον το δείγμα ψυχθεί στους 6-12 °C αμέσως μετά τη δειγματοληψία και μετράται μέσα σε 72 ώρες από τη δειγματοληψία.

- 6.2.2. Ένα δείγμα που έχει ήδη συντηρηθεί με ορθοβορικό οξύ μπορεί να συντηρηθεί επί 48 ώρες ακόμα χρησιμοποιώντας διχρωμικό κάλιο .

Σημείωση

Πρέπει να εξετάζονται οι τοπικές συνθήκες (όροι) που αφορούν την απόρριψη λυμάτων για δείγματα συντηρημένα με διχρωμικό κάλιο.

7. Διαδικασία

7.1. Προεπεξεργασία του δείγματος

Το γάλα προς εξέταση πρέπει να φυλάσσεται μετά την άμελη επί τουλάχιστον 24 ώρες στους 2-6 °C περίπου . Δεν συνίσταται η μέτρηση των δειγμάτων την ημέρα της άμελης χωρίς προεπεξεργασία, επειδή τα αποτελέσματα μπορεί να είναι υπερβολικά χαμηλά. Εάν χρειαστεί να μετρηθεί τέτοιο δείγμα, πρέπει

να προεπεξεργαστεί επί τρεις τουλάχιστον ώρες με διχρωμικό κάλιο (βλέπε σημείο 6.2.1).

7.2. Προετοιμασία

Το προεπεξεργασμένο δείγμα (7.1), ή το μη επεξεργασμένο δείγμα που είναι τουλάχιστον μιας ημέρας, θερμαίνεται σε υδρόλουτρο (5.2) στους 40 °C. Μετά, το δείγμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να γίνουν οι μετρήσεις.

7.3. Καταμέτρηση κυττάρων

Η καταμέτρηση πρέπει να πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το όργανο μέτρησης (5.1) μέσα σε 15 λεπτά από το τέλος της θέρμανσης (βλέπε σημείο 7.2). Αμέσως πριν από τη μέτρηση, το δείγμα πρέπει να αναμειχθεί πλήρως για να επιτευχθεί μια κατά το δυνατόν ομοιογενής κατανομή των σωματικών κυττάρων.

Η περαιτέρω αραίωση και προετοιμασία του δείγματος θα πραγματοποιηθεί αυτόματα στο όργανο.

8. Ακρίβεια

Δεν υπάρχουν στοιχεία επαναληψιμότητας (r) και αναπαραγωγιμότητας (R) από διεθνείς δοκιμές συνεργασίας.

Στο μέλλον θα αναφερθούν δεδομένα ακρίβειας.

Τα διαθέσιμα δεδομένα σε εθνικό επίπεδο επιτρέπουν τις ακόλουθες εκτιμήσεις:

Επίπεδο καταμέτρησης κυττάρων μεταξύ 400 000 και 500 000/ml

- τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας:

$$s_r = 20\,000 \text{ κύτταρα/ml}$$

- (ένας ισοδύναμος συντελεστής διακύμανσης 5-4 %),
- τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας:
 $s_r = 40\ 000$ κύτταρα/ml
(ένας ισοδύναμος συντελεστής διακύμανσης 10-8 %).

9. Έλεγχος πιστότητας

Ο έλεγχος της πιστότητας πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής περιεκτικότητας κυττάρων, προσδιορισμένης με μικροσκοπικές μετρήσεις κυττάρων σε εθνικό εργαστήριο αναφοράς.

VIII . ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς ανίχνευσης αντιβιοτικών και σουλφοναμίδιων σε ακατέργαστο γάλα και σε θερμικά επεξεργασμένο γάλα.

Η διαδικασία αναφοράς περιλαμβάνει:

A. Ποιοτική μέθοδος

Η διαδικασία αυτή είναι η αρχική διαδικασία κατά την οποία εντοπίζονται δείγματα γάλακτος περιέχοντα αντιβιοτικά περιλαμβανομένων των σουλφοναμίδιων. Η περιγραφόμενη διαδικασία είναι μια από παρόμοιες διαδικασίες, οι οποίες κατά βάση όλες χρησιμοποιούν τον *Bacillus stearothermophilus* var . *calidolactis*, ATCC 10149 ως οργανισμό ελέγχου. Η διαδικασία έχει επιλεγεί ως αντιπροσωπευτική για τέτοιους ελέγχους.

B. Διαδικασία για επιβεβαίωση και ταυτοποίηση πενικιλίνης

Η διαδικασία αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιωθούν τα

αποτελέσματα της ποιοτικής μεθόδου, να ταυτοποιηθεί η παρουσία πενικιλίνης και να προσδιοριστεί η συγκέντρωση πενικιλίνης.

A. Ποιοτική μέθοδος

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η διαδικασία καθορίζει τον ποιοτικό προσδιορισμό αντιβιοτικών και σουλφαμίδιων, σε ακατέργαστο και θερμικά επεξεργασμένο γάλα, που υπερβαίνουν τα όρια που καθορίζονται στον κατωτέρω πίνακα:

Ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις διαφόρων αντιβιοτικών και σουλφοναμίδιων (1)

	Ευαισθησία δοκιμής	
	Όλα θετικά	Όλα αρνητικά
Βενζυλοπενικιλίνη	0,002	0,006
Αμπικιλίνη	0,002	0,005
Κλοξακιλλίνη	0,015	0,035
Ναφκιλλίνη	0,006	0,011
Τετρακυκλίνη	0,10	0,40
Οξυτετρακυκλίνη	0,20	0,45
Χλωροτετρακυκλίνη	0,15	0,50
Χλωραμφενικόλη	7,	15,
Διύδροστρεπτομυκίνη	4,	13,
Νεομυκίνη	1,	22,
Καναμυκίνη	9,	28,
Βακτρακίνη	0,06	0,14
Ερυθρομυκίνη	1,	2,25
ΡΙφαμυκίνη	0,01	0,14
Διαφαινυλσουλφόνη	0,01	0,1
Σουλφαμεθαζίνη (Σουλφαδιμιδίνη)	0,5	1

- (1) Βενζυλοπενικιλίνη και βακιτρακίνη εκφρασμένες σε UI/ml, όλα τα άλλα αντιβιοτικά σε µg/ml.

2. Ορισμός

Το γάλα περιέχει αντιβιοτικά ή σουλφοναμίδια όταν το χρώμα του υποστρώματος δεν μεταβάλλεται (βλέπε σημείο 7.1).

2. Αρχή

Προστίθεται δείγμα γάλακτος μαζί με θρεπτικά συστατικά σε πήγμα από άγαρ που περιέχει δείκτη pH και σπόρια του *Bacillus Stearotherophilus* Var. *Calidolactis* ATCC 10149 (5.4.1), ο οποίος έχει μια καλή γενική ευαισθησία και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε αναστολή με πενικιλίνη. Η επώαση που οδηγεί στην κανονική ανάπτυξη και παραγωγή οξέος από τον οργανισμό, προκαλεί την αλλαγή του χρώματος του δείκτη pH από πορφυρό σε κίτρινο. Η παρουσία στο γάλα ουσιών που αναστέλλουν την ανάπτυξη του οργανισμού είναι η αιτία που το χρώμα του δείκτη pH παραμένει πορφυρό.

4. Όργανα και γυάλινα σκεύη

Ο συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός και ιδιαίτερα:

4.1. Όργανα

4.1.1. Επωαστής, ικανός να διατηρεί θερμοκρασία 64 ± 1 °C.

4.1.2. Υδρόλουτρο, ικανό να λειτουργεί στους 64 ± 1 °C.

4.1.3. Στήριγμα, για σωλήνες ή φύσιγγες.

4.1.4. Σιφώνιο, με αντικαταστάσιμα ακροφύσια μίας χρήσης, κατάλληλα για δειγματοληψία και παροχή 0,1 ml.

4.1.5. Τανάλιες ή λαβίδες

4.1.6. Κλίβανος θερμού αέρα, ικανός να λειτουργεί στους 170 έως 175 °C.

4.1.7. Αυτόκλειστο, ικανό να λειτουργεί στους 121 ± 1 °C .

4.1.8. pHμετρο

4.2. Γυάλινα σκεύη

4.2.1. Φιάλες δείγματος με κατάλληλα κλεισίματα.

Σημείωση

Μερικά πώματα από ελαστικό μπορεί να αποθέσουν ανασταλτικές ουσίες στο λαιμό της φιάλης.

4.2.2. Τρυβλία Petri, από διαφανές, άχρωμο γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό με επίπεδους πυθμένες ομοιόμορφου πάχους, ελάχιστης εσωτερικής διαμέτρου 140 mm.

4.2.3. Φιάλες, χωρητικότητας 250 ml.

4.2.4. Σιφώνια, (πρωματισμένα με ακατέργαστο βάμβακα) από γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό ονομαστικής χωρητικότητας 1 ml και 10 ml.

4.2.5. Γυάλινες σπάτουλες

4.2.6. Σωλήνες ή φύσιγγες, εσωτερικής διαμέτρου περίπου 8 mm, με καπάκια ή πώματα.

4.2.7. Αποστείρωση γυάλινων σκευών

Τα γυάλινα σκεύη πρέπει να αποστειρώνονται με μια από τις ακόλουθες μεθόδους:

- (α) διατηρούμενα στους 170 έως 175 °C επί όχι λιγότερο από μια ώρα σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1 .6);
- (β) διατηρούμενα στους 121 ± 1 °C επί όχι λιγότερο από 20 λεπτά σε αυτόκλειστο (4.1.7).

Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται η επαρκής διείσδυση ατμού στο αυτόκλειστο: αν ο εξοπλισμός αποστειρώνεται σε δοχεία, αυτά δεν πρέπει να είναι ερμητικά κλεισμένα, οι φιάλες και τα φιαλίδια πρέπει να έχουν χαλαρά πώματα.

Τα γυάλινα σκεύη που αποστειρώθηκαν στο αυτόκλειστο πρέπει να στεγνώνονται με απαγωγή του ατμού.

Τα σιφώνια πρέπει να αποστειρώνονται σε κλίβανο θερμού αέρα.

5. Υποστρώματα, διαλύματα, δοκιμαστικός οργανισμός

Τα συστατικά των υποστρωμάτων πρέπει να είναι κατάλληλα για βακτηριολογικές αναλύσεις. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο σε γυάλινη διάταξη ή αφαλατωμένο ισοδύναμης καθαρότητας. Δεν πρέπει να περιέχει ουσίες ανασταλτικές στον δοκιμαστικό οργανισμό.

5.1. Υποστρώματα

5.1.1. Θρεπτικό άγαρ

Σύσταση

Εκχύλισμα μαγιάς

2 g

Πεπτόνη	5 g
Εκχύλισμα κρέατος	1 g
Χλωριούχο νάτριο	5 g
Άγαρ	10-15 g
Νερό	1 000 ml

Παρασκευή

Τα συστατικά διαλύονται σε νερό . Φέρονται σε βρασμό, αναδευόμενα κατά διαστήματα. Το pH προσαρμόζεται έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,4 \pm 0,1$ στους 25 °C.

Κατανέμονται ποσότητες των 10 ml μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες για να σχηματιστούν κεκλιμένα σώματα άγαρ ή ποσότητες των 100 ml μέσα σε φιάλες.

Αποστειρώνονται στους 121 ± 1 ° C επί 15 λεπτά.

5.1.2. Υπόστρωμα άγαρ

Σύσταση

Χλωριούχο νάτριο	2 g
Άγαρ	15 g
Νερό	1 000 ml
Διάλυμα τριμεθοπρίμης ή τετροξοπρίμης (βλέπε σημείο 5 .1.3) (²)	10 ml

Παρασκευή

Διαλύονται τα συστατικά εκτός της τριμεθοπρίμης ή της τετροξοπρίμης σε νερό. Φέρονται σε βρασμό, αναδευόμενα κατά διαστήματα. Προστίθεται τριμεθοπρίμη ή τετροξοπρίμη και αποστειρώνονται στους 121 ± 1 °C επί

15 λεπτά. Το pH προσαρμόζεται έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,0 \pm 0,1$ στους 25 °C.

5.1.3. Διάλυμα τριμεθοπρίμης (trimethoprim) ή τετροξοπρίμης (tetroxoprim)

Σύσταση:

τριμεθοπρίμη	5 mg
ή τετροξοπρίμη	30 mg
Αιθανόλη 96 %	5 ml ή 30 ml
Νερό αποσταγμένο μέχρι	1 000 ml

Παρασκευή

Διαλύεται η τριμεθοπρίμη ή τετροξοπρίμη στην αιθανόλη (5 ή 30 ml) και αραιώνεται με νερό.

5.1.4. Θρεπτικό παρασκεύασμα

Σύσταση

Εκχύλισμα μαγιάς	0,75 mg
Γλυκόζη	5,0 mg
Διαλυτό άμυλο	8,0 mg
Πορφυρό βρωμοκρεζόλης	0,025 g
Νερό μέχρι	50 ml

Παρασκευή

Τα υλικά και ο δείκτης διαλύονται σε νερό θερμαίνοντας, αν χρειάζεται, και

αποστειρώνεται το διάλυμα με διήθηση. Το θρεπτικό παρασκεύασμα διατίθεται στο εμπόριο σε παστίλιες.

5.2. Πρότυπα διαλύματα πενικιλίνης

5.2.1. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα πενικιλίνης των 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = (100 IU/ml) διαλύοντας κρυσταλλικό άλας νατρίου ή καλίου της βενζυλοπενικιλίνης σε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό σε κατάλληλα πωματισμένη αποστειρωμένη φιάλη.

5.2.2. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα εργασίας από πενικιλίνη αραιώνοντας 1,25 ml από το διάλυμα πενικιλίνης (5.2.1) στα 1 000 ml, με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό. Αυτό το διάλυμα εργασίας περιέχει 0,075 μg πενικιλίνης/ml (= 0,125 UI πενικιλίνης/ml).

5.2.3. Παρασκευάζονται 75 ml ενός προτύπου διαλύματος πενικιλίνης που περιέχει 0,004 μg πενικιλίνης/ml (= 0,0067 IU πενικιλίνης/ml) προσθέτοντας 71 ml γάλακτος ελεύθερου ανασταλτικών ουσιών (5.3) σε 4 ml διαλύματος εργασίας πενικιλίνης (5.2.2) και αναμειγνύοντας τα δύο υγρά.

5.2.4. Τα διαλύματα πενικιλίνης που μνημονεύονται στα σημεία 5.2.1 έως 5.2.3, πρέπει να παρασκευάζονται την ημέρα της δοκιμασίας.

5.3. Γάλα απηλλαγμένο αναστολέων

Παρασκευάζεται ως δείγμα ελέγχου γάλα απηλλαγμένο αναστολέων ανασυστώντας σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (10 % w/v) προηγούμενα ελεγμένου ως απηλλαγμένου ανασταλτικών ουσιών, σε αποστειρωμένο νερό. Εναλλακτικά, μια επαρκής ποσότητα νωπού χύμα γάλακτος ελεγμένου ως απηλλαγμένου ανασταλτικών ουσιών μπορεί να διαμοιραστεί σε φιάλες, να θερμανθεί επί μια ώρα στους 100 °C και κατόπιν να διατηρηθεί σε ψυγείο στους 0-6 °C για μια μέγιστη περίοδο μιας εβδομάδας.

5.4. Δοκιμαστικός οργανισμός

5.4.1. Ως δοκιμαστικός οργανισμός χρησιμοποιείται ο *Bacillus Stearothermophilus* variete *Calidolactus*, φυλή ATCC 10149 . Η φυλή είναι η ίδια με τη C 953.

5.4.2. Παρασκευάζεται μητρική καλλιέργεια προς διατήρηση της δοκιμαστικής καλλιέργειας. Η δοκιμαστική καλλιέργεια διατηρείται πάνω σε κεκλιμένο τεμάχιο θρεπτικού άγαρ (5.1.1). Το τεμάχιο του άγαρ εμβολιάζεται επιφανειακά κατά λωρίδες, χρησιμοποιώντας βρόγχο που φέρει τη δοκιμαστική καλλιέργεια και επωάζεται αεροβίως επί 48 ώρες στους 63 ± 1 °C. Μετά την αποστείρωση ο σωλήνας σφραγίζεται με αποστειρωμένο πώμα από ελαστικό. Η μητρική καλλιέργεια που παραλαμβάνεται με τον τρόπο αυτό μπορεί να διατηρηθεί επί αρκετούς μήνες σε ψυγείο στους 0 έως 5°C .

5.5. Δοκιμαστική καλλιέργεια (αιώρημα σπορίων)

5.5.1. Μεταφέρονται ασηπτικά 20 ml θρεπτικού άγαρ (5.1.1) σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri (4.2.2) και ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου.

5.5.2. Μεταφέρονται 5 ml αποστειρωμένου απεστραγμένου νερού με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.4) σε σωλήνα με μητρική καλλιέργεια (5.4.2) και τα σπόρια αποξέονται από το κεκλιμένο τεμάχιο άγαρ χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βρόγχο. Αυτό το αιώρημα σπορίων πρέπει να διατηρείται στους 5 °C και να χρησιμοποιείται μέσα σε 36 ώρες.

5.5.3. Μεταφέρονται 0,5 ml αιωρήματος σπορίων (5.5.2) με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.4) σε πλάκα καλλιέργειας (5.5.1) και το εμβόλιο διασπείρεται επιμελώς πάνω σε όλη την επιφάνεια με κεκλιμένη γυάλινη ράβδο. Επωάζεται στους 63 ± 1 °C (4.1.1) επί 16 έως 18 ώρες.

Όταν χρησιμοποιείται μητρική καλλιέργεια (5.4.2) ή καλλιέργεια παλαιότερη των 36 ωρών, η διαδικασία υποκαλλιέργειας πρέπει να εκτελείται τουλάχιστον δύο φορές, με όχι περισσότερο από ένα διάστημα 36 ωρών μεταξύ τους.

5.5.4. Μεταφέρονται 10 ml απεσταγμένου νερού χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.4) στην πλάκα καλλιέργειας (5.5.3) και αποξέονται σπόρια από την επιφάνεια μέσα στο αιώρημα χρησιμοποιώντας γυάλινη ράβδο .

Το αιώρημα των σπορίων (4.2.3) μεταφέρεται σε φιάλη (5.2.3) που περιέχει 250 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού. Η φιάλη κλείνεται και ανακινείται καλά. Οι καλλιέργειες που δεν πρόκειται να ανακαλλιεργηθούν αμέσως πρέπει να διατηρηθούν σε ψυγείο στους 0-6 °C .

5.5.5. Το αιώρημα των σπορίων πρέπει να έχει έναν αριθμό βιώσιμων αποικιών μεταξύ 5 και 10 εκατομμυρίων ανά ml σε μέτρηση πλάκας υποστρώματος άγαρ (5.1.2) επωασμένου στους 63 ± 1 °C επί 16 έως 18 ώρες. Το αιώρημα των σπορίων πρέπει να έχει ομοιόμορφη θολερότητα και, εάν περιέχει θρομβώματα ή ίζημα, πρέπει να απορριφθεί και να παρασκευαστεί νέο αιώρημα από την μητρική καλλιέργεια (5.4.2).

5.6. Προετοιμασία των δοκιμαστικών σωλήνων/φυσίγγων

5.6.1. Το υπόστρωμα από άγαρ (5.1.2) τήκεται και ψύχεται στους 55 °C.

5.6.2. Προστίθεται ένα μέρος πρόσφατου αιωρήματος σπορίων (5.5.4) σε πέντε μέρη του υποστρώματος από άγαρ (5.6.1) μέσα σε σωλήνα ή φιάλη και αναμειγνύονται πλήρως.

5.6.3. Μεταφέρονται 0,3 ml του εμβολιασμένου υποστρώματος (5.6.2), υπολογισμένα να δημιουργήσουν μια στιβάδα πάχους 5 mm, σε αποστειρωμένο σωλήνα ή φύσιγγα (4.2.6) που κλείνεται με πώμα ή κάλυμμα ή με τήξη του στόμιου . Οι δοκιμαστικοί σωλήνες/φύσιγγες αφήνονται να ψυχθούν σε κάθετη θέση, για να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα και μετά αφήνονται έτσι επί τουλάχιστον 12 ώρες .

5.6.4. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες/φύσιγγες μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την ίδια μέρα, αλλά μπορούν να διατηρηθούν επί αρκετούς μήνες εφόσον ψυχθούν αμέσως μετά την παρασκευή και φυλαχθούν στους 0-6 °C.

6. Διαδικασία

6.1. Τα δείγματα πρέπει να εξετάζονται κατά το δυνατόν συντομότερα και κατά προτίμηση μέσα σε 24 ώρες από τη δειγματοληψία, διατηρώντας ενδιάμεσα τα δείγματα μεταξύ 0 και 5 °C. Εάν δεν είναι δυνατόν να εξεταστούν τα δείγματα μέσα σε 24 ώρες, θα πρέπει να παραμείνουν σε κατάψυξη (- 30 έως -15 °C) για να ελαχιστοποιηθεί η αδρανοποίηση της πενικιλίνης.

6.2. Κάθε σωλήνας/φύσιγγα (5.6) επισημαίνεται ευανάγνωστα και ανεξίτηλα. Αποσύρεται το κάλυμμα ή πώμα. Ο απαιτούμενος αριθμός δειγμάτων και μαρτύρων (5.2 και 5.3) προς εξέταση τοποθετείται σε κατάλληλο στήριγμα (4.1.3).

6.3. Προστίθενται 50 μικρολίτρα του θρεπτικού παρασκευάσματος (5.1.4) σε κάθε σωλήνα/φύσιγγα.

6.4. Το δείγμα γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως και μεταφέρονται με τη σύριγγα (4.1.4) 0,1 ml μέσα στον αντίστοιχα επισημασμένο σωλήνα/φύσιγγα. Χρησιμοποιείται ένα καθαρό, αντικαταστάσιμο ακροφύσιο για κάθε μεταφερόμενο δείγμα.

6.5. Επαναλαμβάνεται εις διπλούν η διαδικασία που περιγράφηκε στο σημείο 6.4 χρησιμοποιώντας το πρότυπο διάλυμα πενικιλίνης που περιέχει 0,004 µg/ml (= 0,0067 UI/ml) πενικιλίνης αντί για το δείγμα γάλακτος (5.2.3.).

6.6. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία του σημείου 6.4 εις διπλούν χρησιμοποιώντας το μάρτυρα από γάλα απηλλαγμένο αναστολέων (5.3) αντί για το δείγμα γάλακτος.

- 6.7. Οι σωλήνες/φύσιγγες κλείνονται, και το στήριγμα που φέρει τους σωλήνες/φύσιγγες τοποθετείται σε υδρόλουτρο στους $63 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.1.2) επί τουλάχιστον $2^{1/2}$ έως $2^{3/4}$ ώρες.
- 6.8. Το στήριγμα που φέρει τους σωλήνες/φύσιγγες αποσύρεται από το υδρόλουτρο.
- 6.9. Παρατηρείται το χρώμα του δοκιμαστικού υποστρώματος (βλέπε σημείο 7).
7. Ερμηνεία αποτελεσμάτων
 - 7.1 Ένας πορφυρός χρωματισμός του δοκιμαστικού υποστρώματος σε οποιοδήποτε σωλήνα/φύσιγγα του δείγματος γάλακτος ή του μάρτυρα υποδηλώνει την παρουσία στο δείγμα αντιβιοτικών ή σουλφοναμίδιων στο, ή περίπου στο, επίπεδο "όλο θετικό" όπως δίνεται στον πίνακα της σελίδας 183 χρωματισμός των σωλήνων/φυσίγγων με πρότυπο διάλυμα πενικιλίνης (6.5) παραμένει πορφυρός, σαν έλεγχος της επαρκούς ευαισθησίας του δοκιμαστικού υποστρώματος.
 - 7.2. Πορφυρός χρωματισμός τμήματος μόνο του δοκιμαστικού υποστρώματος ή ακανόνιστος χρωματισμός σε οποιοδήποτε από τους σωλήνες/φύσιγγες του δείγματος γάλακτος υποδηλώνει την ύπαρξη στο δείγμα ανασταλτικών ουσιών μεταξύ των επιπέδων που δίνονται στον πίνακα της σελίδας 183.
 - 7.3. Κίτρινος χρωματισμός του υποστρώματος σε οποιοδήποτε σωλήνα/φύσιγγα του δείγματος γάλακτος ή του μάρτυρα υποδηλώνει την απουσία ουσιών ανασταλτικών στον δοκιμαστικό οργανισμό.
 - 7.4. Εάν υπάρχει προοφυρός χρωματισμός σε όλους του σωλήνες/φύσιγγες που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανόμενου και του αρνητικού ελέγχου οι σωλήνες/φύσιγγες δεν περιέχουν βιώσιμα σπόρια και τα δείγματα πρέπει να επανεξεταστούν με πρόσφατα παρασκευασμένα δοκιμαστικά υλικά.

8. Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων

- 8.1. Όλα τα δείγματα επιβεβαιώνονται με αντιδράσεις κατά τα περιγραφόμενα στα σημεία 7.1 και 7.2 σύμφωνα με τη "Μέθοδο Β".

Εάν χρειαστεί, τα δείγματα γάλακτος να αποθηκευτούν πριν την επιβεβαίωση, πρέπει να καταψυχθούν για να προληφθεί η αποδόμηση αντιβιοτικών.

B. Διαδικασία επιβεβαίωσης πενικιλίνων και προσδιορισμός συγκέντρωσης

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η διαδικασία καθορίζει τη δοκιμή επιβεβαίωσης πενικιλίνων και αντιβιοτικών εκτός πενικιλίνων και τη διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης πενικιλίνης σε δείγματα γάλακτος με θετική (A.7.1) ή αμφίβολη αντίδραση (A.7.2).

Ευαισθησία διαφόρων αντιβιοτικών στη μέθοδο

Βλέπε A.1.

2. Ορισμός

- 2.1. Το δείγμα γάλακτος περιέχει αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένου σουλφοναμίδιου όταν το δείγμα εμφανίζει με την περιγραφόμενη μέθοδο ευκρινή ζώνη αναστολής, των 2 mm τουλάχιστον, γύρω από το δίσκο.

- 2.2. Εάν ένα δείγμα, που περιέχει αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένου σουλφοναμίδιου (2.1) και στο οποίο έχει προστεθεί πενικιλινάση (β-λακταμάση), δεν παρουσιάζει ευκρινή ζώνη ή παρουσιάζει ευκρινή ζώνη μικρότερης διαμέτρου απ' ότι χωρίς πενικιλινάση, η ανασταλτική ουσία είναι

είτε πενικιλίνη είτε πενικιλίνη μαζί με άλλο αντιβιοτικό συμπεριλαμβανομένου του σουλφοναμίδιου.

- 2.3. Εάν η ζώνη δεν αδρανοποιείται από την πενικιλινάση (2.2), η ανασταλτική ουσία στο δείγμα γάλακτος δεν είναι πενικιλίνη, αλλά μπορεί να είναι κάποιο άλλο υπόλλειμμα.

Μερικές από τις ημι-συνθετικές πενικιλίνες, π.χ . άλας νατρίου της κλοξακιλλίνης, δεν αδρανοποιούνται καθόλου ή μόνο μερικώς με πινικιλινάση ή είναι εντελώς ανθεκτικές και, επομένως, δεν αναγνωρίζονται ως πενικιλίνη (βλέπε σημείο 7.3).

3. Αρχή

Ένας δίσκος απορροφητικού χάρτου διαποτισμένος με το προς εξέταση γάλα τοποθετείται στην επιφάνεια υποστρώματος άγαρ εμβολιασμένου με *Bacillus stearothermophilus* variete *calidolactis*. Η επώαση που οδηγεί στην κανονική ανάπτυξη του οργανισμού προκαλεί το θόλωμα του άγαρ. Η παρουσία στο γάλα ουσιών που αναστέλλουν την ανάπτυξη των οργανισμών υποδηλώνεται από μια ευκρινή ζώνη γύρω από το δίσκο. Το μέγεθος της ευκρινούς ζώνης εξαρτάται, πέρα από άλλους παράγοντες, και από τη συγκέντρωση και το είδος της ανασταλτικής ουσίας στο γάλα.

4. Όργανα, γυάλινα σκεύη και εξοπλισμός

Όργανα

Βλέπε A.4.1.

Υδρόλουτρο, ικανό να λειτουργεί στους 80 ± 1 °C.

4.2. Γυάλινα σκεύη

Βλέπε Α.4.2.

- 4.3. Χάρτινοι δίσκοι, απηλλαγμένοι αναστολέων, διαμέτρου 9 έως 13 mm, ικανοί να συγκρατήσουν 130 mg γάλακτος περίπου (κατά προτίμηση φυλάσσονται σε αποξηρανή).
5. Συστατικά υποστρώματος, πρότυπα διαλύματα, διάλυμα πενικιλινάσης, αντιδραστήρια, δοκιμαστικός οργανισμός, κ.λ.π.

Τα συστατικά των υποστρωμάτων πρέπει να είναι κατάλληλα για βακτηριολογικές χρήσεις. Το νερό που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει αποσταχθεί σε γυάλινη διάταξη ή απιονιστεί έως ισοδύναμη τουλάχιστον καθαρότητα. Δεν πρέπει να περιέχει ουσίες ανασταλτικές στον δοκιμαστικό οργανισμό.

5.1. Υποστρώματα

5.1.1. Θρεπτικό άγαρ (Α.5.1.1)

5.1.2. Δοκιμαστικό υπόστρωμα για την ανίχνευση ανασταλτικών ουσιών

Σύσταση

Εκχύλισμα μαγιάς	2,5 g
Τρυπτόνη	5 g
Γλυκόζη	1 g
Διάλυμα τριμεθοπρίμης (ή τετροξοπρίμης) (Α.5.1.3)	10 ml

Αγαρ	10-15 g (ανάλογα με την πηκτική ιδιότητα)
Νερό	1 000 ml

Παρασκευή

Τα στερεά συστατικά διαλύονται πλήρως σε νερό θερμαίνοντας και αναδεύοντας πριν προστεθεί το διάλυμα τριμεθοπρίμης ή τετροξοπρίμης. Μετά την προσθήκη του διαλύματος τριμεθοπρίμης ή τετροξοπρίμης, το pH πρέπει να διορθωθεί έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $8,0 \pm 0,1$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το υπόστρωμα αποστειρώνεται επί 15 λεπτά στους $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2. Πρότυπα διαλύματα πενικιλίνης σε γάλα

Βλέπε A.5.2.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ανασταλτικών ουσιών (θ) παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα πενικιλίνης σε γάλα απηλλαγμένο αναστολέων (A.5.3) με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

(α) 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (0,0067 IU/ml)-

(β) 0,006 $\mu\text{g/ml}$ (0,01 IU/ml) –

(γ) 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (0,05 IU/ml)-

(δ) 0,06 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 IU/ml).

5.3. Διάλυμα πενικιλινάσης

5.3.1. Διαλύεται επαρκής ποσότητα πενικιλινάσης (β-λακταμάσης) σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό ώστε να προκύψει συγκέντρωση 1 000

U/ml. Το διάλυμα αυτό, κατά προτίμηση κατανεμημένο σε μικρές δόσεις, μπορεί να διατηρηθεί στους 0-5 °C έως τέσσερις εβδομάδες.

Σημείωση

Δεν υπάρχει ενιαίο διεθνές πρότυπο για την πενικιλινάση. Για τις ανάγκες της παρούσας μεθόδου, θεωρείται ότι δέκα μονάδες πενικιλινάσης αρκούν για να αδρανοποιηθούν 0,6 μg (= 1 IU) πενικιλίνης. Για πηγές πενικιλινάσης άγνωστης δυναμικότητας (ενεργότητας) θα πρέπει να ελεγχθεί αν η εκτίμηση αυτή έχει ισχύ. Διαφορετικά θα πρέπει να μεταβληθεί ανάλογα η συγκέντρωση του διαλύματος πενικιλινάσης.

5.3.2. Αντί διαλύματος πενικιλινάσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν προετοιμασμένοι δίσκοι με πενικιλινάση διαθέσιμοι στο εμπόριο εάν, μετά από διαδικασία ελέγχου βρεθούν να περιέχουν κατάλληλη ποσότητα πενικιλινάσης.

5.4. Δοκιμαστικός οργανισμός

Βλέπε A.5.4.

5.5. Δοκιμαστική καλλιέργεια (αιώρημα σπορίων)

Βλέπε A.5.5.

5.6. Προετοιμασία δοκιμαστικών πλακών

5.6.1. Το δοκιμαστικό υπόστρωμα για την ανίχνευση ανασταλτικών ουσιών (5.1.2) τήκεται και ψύχεται στους 55 °C.

5.6.2. Προστίθεται σε φιάλη ένα μέρος πρόσφατου αιωρήματος σπορίων (5.5) σε τόσα μέρη δοκιμαστικού υποστρώματος για την ανίχνευση ανασταλτικών ουσιών (5.1.2) για να προκύψει μια κατάλληλη πυκνότητα αποικιών στο εμβολιασμένο δοκιμαστικό υπόστρωμα, και αναμειγνύονται πλήρως.

- 5.6.3. Το εμβολιασμένο δοκιμαστικό υπόστρωμα (5.6.2) μεταφέρεται σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri (A.4.2.2) που έχει θερμανθεί προηγούμενα στους 55 °C, για να σχηματίσει στιβάδα πάχους 0,6 έως 0,8 mm. Για τρυβλίο Petri εσωτερικής διαμέτρου 140 mm χρειάζονται περίπου 15 ml δοκιμαστικού υποστρώματος για να αποκτηθεί πάχος 0,8 mm.
- 5.6.4. Τα τρυβλία Petri μεταφέρονται σε ψυχρή, οριζόντια επιφάνεια που έχει προηγούμενα ελεχθεί με αλφάδι οινόπνευματος, τα καλύμματα απομακρύνονται και αφήνεται να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα από άγαρ. Όταν το υπόστρωμα έχει στερεοποιηθεί, επανατοποθετούνται τα καλύμματα πάνω στα τρυβλία, τα οποία μετά αναστρέφονται για να ελαχιστοποιηθεί η συμπύκνωση πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος από άγαρ.
- 5.6.5. Οι δοκιμαστικές πλάκες που προετοιμάζονται με τον τρόπο αυτό μπορούν να διατηρηθούν έως δύο εβδομάδες εφόσον φυλαχθούν σε σφραγισμένο σάκο από πολυαιθυλένιο στους 5 °C αμέσως μετά την προετοιμασία.
- 5.6.6. Για να αναγνωρίζονται τα δείγματα, επισημαίνεται ο πυθμένας των δοκιμαστικών πλακών.
6. Διαδικασία
- 6.1. Προετοιμασία του δείγματος
- 6.1.1. Δείγματα που δίνουν θετικά ή αμφίβολα αποτελέσματα στη "Μέθοδο Α" (A.7.1 και A.7.2) πρέπει να επανελεχθούν, τα ταυτοποιηθούν και να προσδιοριστούν ποσοτικά ως προς την πενικιλίνη.
- 6.1.2. Αρχικά, αυτά τα δείγματα γάλακτος θερμαίνονται στους 80 ± 1 °C επί 10 λεπτά για να αποφευχθεί η επίδραση θερμοσταθών, μη εξειδικευμένων αναστολέων.
- 6.1.3. Μετά από πλήρη ανάμειξη, μεταφέρονται περίπου 10 ml του θερμανθέντος γάλακτος προς ανάλυση μέσα σε κατάλληλη αποστειρωμένη φιάλη με ευρύ

στόμιο. Προστίθενται περίπου 0,4 ml του διαλύματος πενικιλλινάσης (5.3) στο γάλα και αναμειγνύονται πλήρως.

6.2. Ανίχνευση αναστολέων

6.2.3. Ένας χάρτινος δίσκος (4.3) βυθίζεται μέσα στο δείγμα γάλακτος (6.1.2) χρησιμοποιώντας καθαρή, στεγνή λαβίδα. Απομακρύνεται κάθε περίσσεια γάλακτος φέρνοντας σε επαφή το δίσκο με τα τοιχώματα της φιάλης του δείγματος. Ο δίσκος τοποθετείται επίπεδα πάνω στην επιφάνεια της δοκιμαστικής πλάκας (5.6) και πιέζεται προς τα κάτω ελαφρά με τις λαβίδες.

6.2.4. Οι δίσκοι που προετοιμάζονται με τα διάφορα δείγματα γάλακτος πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 20 mm μεταξύ τους και τουλάχιστον 10 mm από την άκρη.

6.2.5. Προκειμένου να ελεγχθεί η ευαισθησία, οι δίσκοι (4.3) που θα βυθιστούν στο πρότυπο διάλυμα πενικιλλίνης [5.2.α)] πρέπει να τοποθετηθούν τυχαία ανάμεσα στους δίσκους με δείγματα γάλακτος σε ποσοστό τουλάχιστον 2 % των δίσκων που θα βυθιστούν ανά δείγμα γάλακτος - πέντε πρότυποι δίσκοι πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια κάθε δοκιμής.

6.2.6. Όταν όλοι οι δίσκοι έχουν τοποθετηθεί πάνω στο υπόστρωμα από άγαρ σε τυχαία διάταξη και έχουν ταυτοποιηθεί, τα τρυβλία αναστρέφονται και επωάζονται στους 63 ± 1 °C επί 2¹/₂ έως 5 ώρες .

6.2.7. Μετά την επώαση τα τρυβλία εξετάζονται μπροστά από κατάλληλη πηγή φωτός ως προς την ύπαρξη διαυγών ζωνών αναστολής γύρω από τους χάρτινους δίσκους. Μετρώνται οι διαυγείς ζώνες .

6.2.8. Οι ζώνες γύρω από τους δίσκους που περιέχουν το πρότυπο διάλυμα πενικιλλίνης (6.2.3) πρέπει να έχουν τουλάχιστον 2 mm πλάτος.

- 6.2.9. Διαυγείς ζώνες γύρω από τους δίσκους που περιέχουν το δείγμα γάλακτος με μέγεθος ίδιο ή μεγαλύτερο από αυτές που περιγράφονται στο σημείο 6.2.6 υποδηλώνουν την παρουσία ουσιών που αναστέλλουν το δοκιμαστικό οργανισμό.
- 6.3. Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός της ανασταλτικής ουσίας
- 6.3.3. Η διαδικασία του σημείου 6.2.1 πραγματοποιείται εις διπλούν στο θερμανθέν δείγμα γάλακτος (6.1.2) και στο επεξεργασμένο με πενικιλινάση δείγμα (6.1.3). Αντί να προστεθεί πενικιλινάση σε 10 ml του δείγματος γάλακτος, μπορεί να βυθιστεί ένας προετοιμασμένος δίσκος πενικιλινάσης (5.3 .2) μέσα στο δείγμα αυτό και να τοποθετηθεί πάνω στη δοκιμαστική πλάκα.
- 6.3.4. Η διαδικασία του σημείου 6.2.1 πραγματοποιείται εις διπλούν για κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα πενικιλίνης που μνημονεύτηκαν στα σημεία 5.2.(α) έως (δ).
- 6.3.5. Πρέπει να προσδιοριστεί η μέση διάμετρος των διαυγών ζωνών αναστολής για το δείγμα γάλακτος και το δείγμα ελέγχου πενικιλινάσης, καθώς και τα πρότυπα διαλύματα πενικιλίνης.
7. Ερμηνεία αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 2)
- 7.1. Εάν δεν υπάρχει διαυγής ζώνη γύρω από το δίσκο που περιέχει το δείγμα ελέγχου πενικιλινάσης, αλλά υπάρχει διαυγής ζώνη γύρω από το δίσκο που περιέχει το δείγμα γάλακτος, ίση με ή μεγαλύτερη από τη ζώνη γύρω από το δίσκο που περιέχει το πρότυπο διάλυμα πενικιλίνης [5.2.(α)], η ανασταλτική ουσία στο δείγμα γάλακτος αντιστοιχεί σε συγκέντρωση άλατος νατρίου ή καλίου της βενζυλοπενικιλίνης τουλάχιστον 0,004 mg/ml .
- 7.2. Εάν η μέση διάμετρος της διαυγούς ζώνης γύρω από τον δίσκο που περιέχει πενικιλινάση είναι ίση με τη μέση διάμετρο της διαυγούς ζώνης γύρω από το δίσκο που περιέχει το δείγμα γάλακτος, το γάλα περιέχει ανασταλτικές ουσίες

που είναι αδύνατο να αδρανοποιηθούν με τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις πενικιλιλινάσης στη μέθοδο αυτή.

- 7.2. Εάν η μέση διάμετρος της διαυγούς ζώνης γύρω από το δίσκο που περιέχει τη πενικιλιλινάση είναι μικρότερη από τη μέση διάμετρο της διαυγούς ζώνης γύρω από το δίσκο που περιέχει το δείγμα γάλακτος θερμανθέν σύμφωνα με το σημείο 6.1.2, το δείγμα γάλακτος περιέχει πενικιλιλίνη μαζί με άλλα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανόμενων των σουλφοναμίδιων εκτός από πενικιλιλίνη ή ημισυνθετική πενικιλιλίνη, η οποία δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις πενικιλιλινάσης στη μέθοδο αυτή. Συνθετικές πενικιλιλίνες, όπως το άλας νατρίου της κλοξακιλλίνης, μπορεί να μην αδρανοποιηθούν με πενικιλιλινάση κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής και μπορεί, επομένως, να χαρακτηρισθούν ως αναστολείς διαφορετικοί από την πενικιλιλίνη.

Σημείωση

Εάν χρειαστεί, μπορεί να αναγνωρισθούν ανασταλτικές ουσίες εκτός της πενικιλιλίνης, χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους.

8. Προσδιορισμός περιεκτικότητας πενικιλιλίνης

- 8.1. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας πενικιλιλίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σχεδιάζοντας καμπύλη αναφοράς είτε με υπολογισμό από τα μεγέθη των ζωνών που ελήφθησαν με τα πρότυπα διαλύματα πενικιλιλίνης σε γάλα [βλέπε σημείο 5.2.(α) έως (δ)].

8.2. Σχεδίαση καμπύλης αναφοράς

Δεδομένου ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του δεκαδικού λογάριθμου της συγκέντρωσης πενικιλιλίνης και της διαμέτρου των ζωνών αναστολής, η καμπύλη αναφοράς μπορεί να σχεδιαστεί σε ημιλογαριθμικό χάρτη με τις συγκεντρώσεις πενικιλιλίνης ως τη λογαριθμική τεταγμένη και τις ζώνες

αναστολής ως την τετμημένη. Οι ζώνες αναστολής υπολογίζονται ως ο μέσος όρος των διπλών δοκιμών. Οι διάμετροι των ζωνών αναστολής φέρονται έναντι των πρότυπων συγκεντρώσεων πενικιλίνης και σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς.

8.3. Υπολογισμός

Οι συγκεντρώσεις πενικιλίνης στο δείγμα γάλακτος μπορούν να υπολογιστούν από τις διαμέτρους των ζωνών τους χρησιμοποιώντας την εξίσωση ή την καμπύλη αναφοράς. Για ακριβείς αναλύσεις, οι ακτίνες των ζωνών παρεμπόδισης πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο φορές και όχι περισσότερο από πέντε φορές μεγαλύτερες από τις ακτίνες των δίσκων.

9. Εκφραση αποτελεσμάτων

9.1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως περιεκτικότητα πενικιλίνης ίση με ή μεγαλύτερη από 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (ή αναφέροντας την προσδιορισθείσα συγκέντρωση) ή ως περιεκτικότητα αναστολέων εκτός πενικιλίνης.

9.2. Επαναληψιμότητα (r) και αναπαραγωγιμότητα (R)

Δεν υπάρχουν στοιχεία, και δεν θα είχαν νόημα, αφού συμπεριλαμβάνεται πρότυπο προς σύγκριση .

Επιπλέον της καθοριζόμενης στο Παράρτημα VIII μεθόδου, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και οποιαδήποτε άλλη μέθοδος για την ανίχνευση της παρουσίας αντιμικροβιακών ουσιών (αντιβιοτικών, σουλφοναμιδών και άλλων χημειοθεραπευτικών και η οποία είναι αποδεκτή σε εθνικό, κοινοτικό ή διεθνές επίπεδο.

IX . ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

1. Ορισμός

Η εξέταση πρέπει να αφορά είδη βακτηρίων που ενέχονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθένειες τροφικής αιτίας.

Η παστερίωση είναι μια επεξεργασία που προλαμβάνει την ύπαρξη μη θερμοάντοχων παθογόνων σε γάλα .

2. Διαδικασία

Οι μέθοδοι και η συχνότητα των αναλύσεων πρέπει να θεσπιστεί από τις τοπικές αρχές, με τρόπο ώστε να είναι δυνατή η έκδοση πιστοποιητικών υγιεινής που να αφορούν θερμικά επεξεργασμένο γάλα προς ενδοκοινοτική διακίνηση . Για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών εφαρμόζονται τα κριτήρια και οι μέθοδοι που είναι διεθνώς αποδεκτές, εφόσον υπάρχουν.

3. Έκθεση αποτελεσμάτων

Για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό που ερευνάται, το αποτέλεσμα πρέπει να εκφράζεται κατά τον ακόλουθο τρόπο:

Αριθμός ανά ml γάλακτος ή "παρουσία" ή "απουσία" στον όγκο του παστεριωμένου γάλακτος που απαιτείται από τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο.

4. Πέραν των εργαστηριακών μεθόδων που καθορίστηκαν στα Παραρτήματα Ε και Ζ, είναι δυνατόν για τους σκοπούς των παρόντων Κανονισμών να χρησιμοποιούνται και άλλοι μέθοδοι οι οποίοι είναι διεθνώς αποδεκτοί.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Η
(Κανονισμός 12(3))

Τύπος Α

Πρότυπο Εντύπου Εγγραφής Υποστατικών

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΉΩΣ 2002
Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΈΓΓΡΑΦΗ ΥΠΟΣΤΑΤΙΚΩΝ

Με την παρούσα έγκριση παρέχεται στον/στην*
..... ΕΚ
αρ. ταυτότητας*/αρ. εγγραφής Εταιρείας*
το δικαίωμα να διατηρεί**
για σκοπούς παραγωγής*/αποθήκευσης*/μεταφοράς*/επεξεργασίας* νωπού γάλακτος*/ προϊόντα με
βάση το γάλα.
Περιγραφή εγκεκριμένου υποστατικού*/οχήματος*

- (α) Κτηριακές εγκαταστάσεις που βρίσκονται στη Διεύθυνση
.....ή Τεμάχιο.....
Φύλλο/Σχέδιο
- (β) *Μηχανοκίνητο όχημα αρ. Εγγραφής

Ημερομηνία:

Ισχύει μέχρι:

Υπογραφή:

Διευθυντής Κτηνιατρικών Υπηρεσιών*

* Απαλείψετε ότι δεν ισχύει.

** Συμπληρώστε: όχημα μεταφοράς, εκμετάλλευση παραγωγής, κέντρο συλλογής.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Η
(Κανονισμός 12(3))**

Πρότυπο Εντύπου Εγγραφής Υποστατικών

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΚΑΙ ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΕΩΣ 2002

Οι περί Υγιεινής και του Επίσημου Ελέγχου των Τροφίμων Κανονισμοί του 2001

Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία) και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΕΓΓΡΑΦΗΣ

Με την παρούσα εγγραφή παρέχεται στον/στην
ΕΚ
 αρ. ταυτότητας*/αρ.εγγραφής Εταιρείας*
 το δικαίωμα να διατηρεί**
 για: σκοπούς παραγωγής*/αποθήκευσης*/μεταφοράς*/επεξεργασίας*νωπού
 γάλακτος*/προϊόντων με βάση το γάλα.
 Περιγραφή/Διεύθυνση εγκεκριμένου υποστατικού*/οχήματος*, με παρέκκλιση ως ο πιο κάτω
 πίνακας*, σύμφωνα με τις πρόνοιες των πιο πάνω Νόμων και Κανονισμών.
 α) Κτιριακές εγκαταστάσεις που βρίσκονται στη Διεύθυνση
ή Τεμάχιο
 Φύλλο/Σχέδιο
 β) *Μηχανοκίνητο όχημα αρ. Εγγραφής

ΠΙΝΑΚΑΣ

Διατάξεις

Κανονισμοί

Αρ. Εγγραφής:

Ημερομηνία:

Ισχύει μέχρι:

Υπογραφή:

Διευθυντής Ιατρικών Υπηρεσιών
και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας

* Απαλείψατε ότι δεν ισχύει

** Συμπληρώστε: Εγκατάσταση επεξεργασίας, εγκατάσταση μεταποίησης, εγκατάσταση μικρού
δυναμικού, κέντρο τυποποίησης.

4543

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Θ
(Κανονισμός 13(4))

Έντυπο δειγματοληψίας προϊόντων με βάση το γάλα*

(α) Πρόσθια όψη:

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΈΩΣ 2002
Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ*

ΜΕΡΟΣ I

Ημερομηνίαώρα

Όνομα δειγματολήπτη

Όνομα ιδιοκτήτη προϊόντων

Διεύθυνση

Όνομα Κατασκευαστή

Διεύθυνση

Είδος

Σημάνσεις

Αριθμός δειγμάτων

Ολική ποσότητα (σε βάρος ή όγκο)

Ζητούμενη εξέταση

ΜΕΡΟΣ II

Ιστορικό

ΜΕΡΟΣ III

Παρέλαβα τα πιο πάνω περιγραφόμενα δείγματα σήμερα
και ώρα στην πιο κάτω περιγραφόμενη κατάσταση:

Όνομα:

Υπογραφή:

Σημ.: Το αποτέλεσμα της Εργαστηριακής Εξέτασης να κοινοποιηθεί τηλεφωνικά στον/στην
.....
αρ.τηλ. και γραπτά στον/στην

Διεύθυνση:

*Το έντυπο συμπληρώνεται εις τετραπλούν. Το πρωτότυπο και πρώτο αντίγραφο αποστέλλονται στο
Εργαστήριο Ελέγχου Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης ή στο Γενικό Χημείο του κράτους. Το δεύτερο αντίγραφο

4544

δίνεται στον ιδιοκτήτη και το τρίτο αντίγραφο παραμένει στο στέλεχος. Μετά την εξέταση το συμπληρωμένο με τα αποτελέσματα πρωτότυπο αποστέλλεται στον παραλήπτη της γραπτής έκθεσης που αναφέρεται πιο πάνω.

(β) Οπίσθια όψη:

ΜΕΡΟΣ IV

Εργαστηριακή Έκθεση: (επισυνάπτεται)

Όνομα:

Υπογραφή:

Ημερομηνία:

4545

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι
(Κανονισμός 13(10))

Έντυπο Κατακράτησης Νωπού Γάλακτος ή Προϊόντων με βάση το γάλα*

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Αύξων αριθμός:

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΈΩΣ 2002
Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Ημερομηνία:

Προς:

.....

Με την παρούσα πληροφορείσθε ότι επιβάλλεται κατακράτηση του γάλακτος ή των προϊόντων σας, που περιγράφονται πιο κάτω, μέχρι τη διερεύνηση από εξουσιοδοτημένο Κτηνιατρικό Λειτουργό ή Υγειονομικό Επιθεωρητή, της καταλληλότητάς τους ή μη για ανθρώπινη κατανάλωση.

Κατά το χρόνο που ισχύει η κατακράτηση, υποχρεούστε να μην πωλήσετε ή άλλως πως διαθέσετε οποιαδήποτε ποσότητα των κατακρατούμενων προϊόντων και να διατηρείτε αυτά, με δικά σας έξοδα, κάτω από κατάλληλες για τη διατήρησή τους συνθήκες, μέχρι την έκδοση απόφασης για την τύχη τους.

Γάλα/Προϊόντα:Λίτρα/Αριθμός κιβωτίων/δοχείων:

Ποσότητα ή βάρος:Σημάνσεις:

Συσκευασία:Χώρος αποθήκευσης:

Υπογραφή:

Όνομα:

Τίτλος:

Παρελήφθη από

τον/την

Υπογραφή:

Ημερομηνία:ώρα

* Συμπληρώνεται εις τριπλούν. Το πρωτότυπο παραδίδεται στον ιδιοκτήτη ή εισαγωγέα ή αντιπρόσωπό τους. Το πρώτο αντίτυπο υποβάλλεται στο Διευθυντή του Τμήματος Κτηνιατρικών Υπηρεσιών ή στο Διευθυντή Ιατρικών Υπηρεσιών ανάλογα με την υπηρεσία που προέρχεται ο λειτουργός ο οποίος επέβαλε την κατακράτηση και το δεύτερο αντίτυπο παραμένει στο στέλεχος.

(α) Πρόσθια όψη

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Κ
(Κανονισμός 13(9))

**Έντυπο κατακράτησης για σκοπούς καταστροφής γάλακτος και προϊόντων
με βάση το γάλα λόγω ακαταλληλότητας**

Αύξων αριθμός:

Ημερομηνία:

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΈΩΣ 2002
Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

**ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗ ΓΙΑ ΣΚΟΠΟΥΣ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ ΛΟΓΩ ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ**

Προς:

Εγώ ο/η εξουσιοδοτημένος Κτηνιατρικός Λειτουργός/
Υγειονομικός Επιθεωρητής, προβαίνω σήμερασε κατακράτηση των πιο
κάτω περιγραφόμενων προϊόντων για σκοπούς καταστροφής τους, τα οποία έχω κρίνει ακατάλληλα
για ανθρώπινη κατανάλωση (με βάση το άρθρο 6 του Νόμου) ή/και με βάση τους παρόντες
Κανονισμούς.

Αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν:

.....

Περιγραφή: Προϊόν Αρ. κιβωτίων

Ποσότητα: Σημάνσεις:

Συσκευασία: Χώρος αποθήκευσης:

Εναντίον της απόφασής μου έχετε δικαίωμα υποβολής ένστασης στον Υπουργό Υγείας εντός 24
ωρών από την επίδοση της παρούσης ή την πρώτη εργάσιμη ημέρα, αν την ημερομηνία ακολουθούν
μη εργάσιμες ημέρες.

Υπογραφή:

Όνομα:

Κτηνιατρικός Λειτουργός*/

Υγειονομικός Επιθεωρητής*

Παραλήφθηκε από τον/την

Όνομα:

Υπογραφή:

Ημερομηνία: ώρα:

(β) Οπίσθια όψη

Επιθυμώ* /δεν επιθυμώ* να υποβάλω ένσταση εναντίον της απόφασης του εξουσιοδοτημένου Κτηνιατρικού Λειτουργού* ή Υγειονομικού Επιθεωρητή*

Όνομα:

Υπογραφή:

Ημερομηνία: ώρα:

* Διαγράψτε ότι δεν ισχύει.

Συμπληρώνεται εις τριπλούν. Το πρωτότυπο παραδίδεται στον ιδιοκτήτη ή αντιπρόσωπό του. Το πρώτο αντίτυπο υποβάλλεται στο Διευθυντή του Τμήματος Κτηνιατρικών Υπηρεσιών ή στο Διευθυντή Ιατρικών Υπηρεσιών ανάλογα με την υπηρεσία που προέρχεται ο λειτουργός που εξέδωσε το έντυπο κατακράτησης για σκοπούς καταστροφής και το δεύτερο αντίτυπο παραμένει στο στέλεχος.

4548

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Λ
(Κανονισμός 13(12))

Έντυπο Επιβολής Ιατρικής Εξέτασης

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Αύξων αριθμός:.....

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΈΩΣ 2002

Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΕΠΙΒΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Προς:

Με την παρούσα πληροφορείστε ότι κατόπιν έρευνας διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν εύλογες υποψίες και στοιχεία –

- (α) Ότι πρόσωπο/α πάσχει/ουν από ή έπαθε/αν μολυσματική νόσο ή τροφική δηλητηρίαση, που προκλήθηκε από κατανάλωση γάλακτος ή προϊόντος με βάση το γάλα που προήλθε από το υποστατικό σας,
- (β) ότι φυλάσσεται στο υποστατικό σας γάλα ή προϊόν με βάση το γάλα το οποίο, αν καταναλωθεί, δυνατόν να προκαλέσει μολυσματική νόσο ή τροφική δηλητηρίαση,
- (γ) ότι πρόσωπο/α που απασχολείται/ούνται στο υποστατικό σας πάσχει/ουν από μολυσματική ασθένεια ή πρόσφατα ήρθε/αν σε επαφή με πρόσωπο που πάσχει από μολυσματική ασθένεια και υπάρχει το ενδεχόμενο εξάπλωσης της μολυσματικής ασθένειας.

Με βάση τις εξουσίες που μου παρέχονται από τους παρόντες Κανονισμούς, σας πληροφορώ ότι επιβάλλεται η άμεση ιατρική εξέταση των πιο κάτω εργαζομένων στο υποστατικό σας:

1.
2.
3.
4.
5.

Ημερομηνία:

Υπογραφή:

Όνομα:

4549

Διευθυντής Ιατρικών Υπηρεσιών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Μ
(Κανονισμός 13(13))

Έντυπο Προσωρινής Απαγόρευσης Απασχόλησης Προσώπου σε Υποστατικό

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Αύξων αριθμός:

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΈΩΣ 2002

Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΠΡΟΣΩΡΙΝΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΣΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗΣ

Προς (τη Διεύθυνση)

.....

..... και

Προς (ενδιαφερόμενο πρόσωπο)

.....

.....

Πληροφορείστε ότι από τις ιατρικές εξετάσεις που διεξήχθησαν, διαπιστώθηκε ότι το πιο πάνω αναφερόμενο ενδιαφερόμενο πρόσωπο που εργάζεται στο υποστατικό πάσχει από μολυσματική ασθένεια που μπορεί να μεταδοθεί και σε άλλους μέσω των παραγόμενων προϊόντων.

Με την παρούσα πληροφορείστε ότι διακόπτω την ισχύ του ιατρικού πιστοποιητικού υγείας του ανωτέρω προσώπου για περίοδο ημερών και επιβάλλω απαγόρευση της απασχόλησής του κατά την αντίστοιχη περίοδο.

Ημερομηνία:

Υπογραφή:

Όνομα:

Διευθυντής Ιατρικών Υπηρεσιών

4550

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ν
(Κανονισμός 15(3)(α), (3))

Έντυπο Επιβολής Διακοπής της Λειτουργίας Υποστατικού

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 1996 ΈΩΣ 2002
Οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Προϊόντων με βάση το Γάλα (Παραγωγή, Παρασκευή και Εμπορία)
και Ελέγχου των Υποστατικών Κανονισμοί του 2002

ΕΠΙΒΟΛΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΥΠΟΣΤΑΤΙΚΟΥ

Προς:

Πληροφορείστε ότι, κατά την εφαρμογή των εξουσιών που μου παρέχονται από τους παρόντες Κανονισμούς, διαπίστωσα ότι –

[Ο εξουσιοδοτημένος Κτηνιατρικός Λειτουργός να αναφέρει έναν από τους λόγους του κανονισμού 15(2). Ο Διευθυντής Ιατρικών Υπηρεσιών ή εκπρόσωπός του να αναφέρει έναν από τους λόγους του κανονισμού 13(7).

Με την παρούσα επιβάλλεται διακοπή της λειτουργίας του Υποστατικού* σας για περίοδο ημερών (1 έως 4) από σήμερα

Κατά την περίοδο αυτή οφείλετε να διορθώσετε τις πιο πάνω αναφερόμενες ελλείψεις ή σοβαρές παραβάσεις, διαφορετικά έχω εξουσία επιβολής περαιτέρω περιόδου διακοπής της λειτουργίας του υποστατικού σας.

Υπογραφή:

ή

Υπογραφή:

Όνομα:

Όνομα:

Υγειονομικός Επιθεωρητής

Κτηνιατρικός Λειτουργός

* σημειώστε το είδος του υποστατικού.