

Наредба № 30 от 20 ноември 2000 г. за ветеринарно-санитарните и хигиенните изисквания при добива на сурово мляко, изграждане и експлоатация на млекопреработвателни предприятия, производството и търговията с топлинно обработено мляко и млечни продукти

Държавен вестник брой: 15

Година: 2006

Орган на издаване:

Дата на обнародване: 17.02.2006

Глава първа

## ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

Чл. 1. С тази наредба се определят ветеринарно-санитарните и хигиенните изисквания при:

1. добива на сурово мляко, производството и търговията със сурово мляко, топлинно обработено мляко за пиене, мляко за производство на млечни продукти и продукти на млечна основа за консумация от хора;
2. изграждане и експлоатация на млекосъбирателните пунктове, млекопреработвателните предприятия, препакетиращите цехове и складове за съхранение на млечни продукти.

Чл. 2. Не се разрешава продажбата на сурово мляко за директна консумация, освен ако не са изпълнени изискванията на приложения № 1 и 2.

Чл. 3.

(1) Суровото мляко се събира в млекосъбирателни пунктове, а обработката и преработката на мляко - в предприятия, които са получили ветеринарномедицинско разрешително по реда на чл.57, т. 8 от Закона за ветеринарномедицинската дейност (ЗВМД) и чл.92 от Правилника за прилагане на Закона за ветеринарномедицинската дейност (ППЗВМД) (ДВ, бр. 55 от 2000 г.).

(2) Млекопреработвателни предприятия, преработващи мляко, които не отговарят на изискванията на наредбата, не получават разрешително по ЗВМД. Продуктите от такива предприятия не носят здравна маркировка и търговията с цел консумация от хора с тях е забранена.

## Глава втора

### ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНИ И ХИГИЕННИ ИЗИСКВАНИЯ КЪМ МЛЕКОПРЕРАБОТВАТЕЛНИТЕ ПРЕДПРИЯТИЯ И МЛЕКОСЪБИРАТЕЛНИТЕ ПУНКТОВЕ

Чл. 4. Млекопреработвателното предприятие се пуска в експлоатация при спазване изискванията на чл.57, т. 7 ЗВМД.

Чл. 5. (Отм., ДВ, бр. 3 от 2006 г.).

Чл. 6. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Производствените сгради се снабдяват с необходимото количество вода, отговаряща на изискванията на Наредба № 9 от 2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели (ДВ, бр. 30 от 2001 г.), с подходящо налягане и температура.

Чл. 7. Във всички помещения в млекопреработвателното предприятие се осигурява естествено или изкуствено осветление, което не променя цвета на млякото.

Чл. 8. Технологичното оборудване в обектите по чл. 1, т. 2, което е в непосредствен контакт със суровото мляко и млечните продукти, е предмет на съгласуване с органите на Държавния санитарен контрол и НВМС при издаването на разрешителното по чл.3, ал. 1 и отговаря на следните изисквания:

1. да е произведено от материали, които не взаимодействат със суровото мляко и млечните продукти, не променят физико-химичния им състав, не отделят токсични вещества и мирис, не придават допълнителен привкус, устойчиви са на корозионното действие, издържат на постоянно почистване и дезинфекция;
2. вътрешната повърхност на материалите по т. 1 да е гладка и да не е боядисана.

Чл. 9. Млекопреработвателните предприятия трябва да имат:

1. работни помещения с достатъчни размери за осъществяване на производствената дейност при подходящи хигиенни условия; тези помещения да се конструират и изграждат по начин, изключващ възможността от замърсяване (контаминация) на суровините и произведените продукти, обект на наредбата;
2. отделни работни помещения за производство на топлинно обработено мляко или на продукти на млечна основа, които могат да представляват опасност от замърсяване на други продукти, обект на тази наредба;

3. работни помещения, в които се извършва работа, приготвяване или преработка на суровините и на произведените продукти, които разполагат със:

а) под от водонепропусклив и устойчив материал, който лесно да се почиства и дезинфекцира, поставен така, че да улеснява оттичането на водата и да разполага с канализационна система за отпадъчните води;

б) гладки стени, боядисани в светли цветове, със заоблени ъгли между тях самите и пода;

в) таван, който да може да се почиства лесно, за помещенията, в които се намират неупаковани суровини за извършване на манипулации, приготвяване или преработка;

г) врати от некорозиращ материал, които да могат лесно да се почистват;

д) достатъчно проветряване и ако е необходимо, ефикасна система за отстраняване на водните пари;

е) достатъчно естествено или изкуствено осветление;

ж) система за почистване и дезинфекция на ръцете, снабдена с течаща - топла или предварително смесена вода до подходяща температура, и хигиенни средства за тяхното подсушаване; в работните помещения и в тоалетните мивките да са снабдени с топла и студена течаща вода или вода, смесена до необходимата температура; крановете на чешмите да не се пускат и спират с ръце;

з) съоръжения за почистване на инструментите и инсталациите;

4. за помещенията за съхраняване на суровините и продуктите, за които се отнася наредбата, са в сила същите изисквания, както в т. 3 от буква "а" до буква "е", с изключение на:

а) хладилните помещения, при които е достатъчно подът да може лесно да се почиства и дезинфекцира и да е изграден по начин, позволяващ лесно оттичане на водата;

б) помещенията за замразяване или за дълбоко замразяване, за които е достатъчно подът да е от непромокаем и негниещ материал и да позволява лесно почистване; вместимостта на складовете да е достатъчна за съхраняването на използваните суровини и продукти, обект на наредбата;

5. съоръжения, отговарящи на хигиенните изисквания за работа и защита на суровините и неупакованите крайни продукти при товарно-разтоварните работи;

6. подходяща система за защита от вредители;

7. технологично оборудване, инструменти или техните повърхности, които влизат в контакт със суровините и произведенията, да бъдат изработени от неръждаем материал, да са лесни за почистване и дезинфекциране и да отговарят на изискванията по чл. 11;

8. специални непромокаеми съдове от неръждаем материал за поставяне на суровините или на продуктите, които не са предназначени за консумация от хора; когато тези суровини или продукти се извеждат чрез тръбопроводи, изграждането и разполагането на тръбопроводите да изключва всяка възможност от замърсяване на другите суровини или продукти; съдовете да са ясно означени и да носят инструкция за тяхното използване;

9. подходящи съоръжения за почистване и дезинфекциране на оборудването и на приборите;
10. канализационна система за отвеждане на отпадъчните води, която да отговаря на санитарно-хигиенните изисквания;
11. (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) съоръжение, което е изключително за подаване на питейна вода съгласно изискванията на Наредба № 9 от 2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели (ДВ, бр. 30 от 2001 г.), с подходящо налягане и температура, която се използва за почистването на съоръженията и инструментите; по изключение се разрешава подаването на промишлената вода за производство на пара, за противопожарни нужди и за охлаждане, при условие че разположените за тази цел водопроводи изключват използването на тази вода за други цели и не представляват никаква пряка или косвена опасност за замърсяване на продуктите; водопроводът за промишлената вода да бъде ясно означен и различен от този за питейна вода;
12. съблекални с гладки и непромокаеми стени и подове, които могат да се почистват лесно, умивалници и тоалетни с казанчета; тоалетните не трябва да имат директна връзка с работните помещения; мивките да са снабдени с топла и студена течаща вода или вода, смесена до необходимата температура, с материали за почистване и дезинфекция на ръцете и хигиенни средства за тяхното подсушаване; крановете на чешмите да не се пускат и спират с ръце;
13. подходящо оборудване и заключваща се стая за ползване от държавния ветеринарен лекар, ако обемът на произвежданите продукти изисква периодично или постоянно присъствие;
14. стая или безопасно място за складиране на миещи препарати, дезинфектанти и подобни вещества;
15. помещение или шкаф за съхраняване на средства и материали за почистване и поддръжка;
16. подходящи съоръжения за почистване и дезинфекциране на цистерните или съдовете за транспортиране на млякото и продуктите на основа на течно мляко или мляко на прах; такива съоръжения не са задължителни, ако съществува изискване средствата за транспортиране да бъдат почиствани и дезинфекцирани с инсталации, официално одобрени от НВМС.

#### Чл. 10.

(1) (Предишен текст на чл. 10, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Млекосъбирателните пунктове отговарят на изискванията по чл. 9, като освен това имат:

1. съоръжения за охлаждане или подходящи средства за охлаждане на мляко и ако млякото се съхранява в млекосъбирателни пунктове - охлаждаща инсталация за съхранение;
2. центрофуга или друга апаратура, подходяща за физическото му пречистване, когато млякото се пречиства в млекосъбирателния пункт.
3. (нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) съоръжения за измерване на количеството и вземане на средна проба и за първичен анализ.

(2) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.; изм., бр. 3 от 2006 г.) Млекосъбирателните пунктове се изграждат извън млекодобивните стопанства.

#### Чл. 11.

(1) Оборудването и инструментите, които се използват за обработка на суровини и продукти, подовете, таваните или покривните облицовки, стените и преградите трябва да се поддържат чисти и в изправност така, че да не представляват източник на заразяване на суровините или продуктите.

(2) Не се разрешава достъп на животни в помещенията, в които се произвеждат и съхраняват млякото и продуктите на млечна основа; гризачи, насекоми и всякакви други паразити трябва систематично да бъдат унищожавани; родентициди, инсектициди, дезинфектанти и всякакви други потенциални токсични вещества трябва да се съхраняват в помещения или шкафове, които се заключват, като тяхната употреба не трябва да представлява никакъв риск от заразяване на продуктите; същите и подобни субстанции трябва да бъдат одобрени от МЗ и използвани така, че да нямат вреден ефект върху машините, оборудването, суровините и продуктите.

(3) Работните помещения, инструментите и работното оборудване се използват само за работа с продуктите, за които са одобрени; с разрешение на НВМС могат да бъдат използвани едновременно или по друго време за работа други хранителни продукти или други продукти на млечна основа, годни за човешка консумация.

#### Чл. 12.

(1) В млекопреработвателните предприятия се спазва висока степен на лична хигиена на персонала. Това се отнася особено до лицата, боравещи с открити, неупаковани суровини и продукти. Те са длъжни да спазват следните изисквания:

1. персоналът да е облечен в подходящо чисто работно облекло и чисти покрития за глава, които напълно да обхващат косата;

2. персоналът, който работи и приготвя суровините, трябва да си мие ръцете всеки път, когато подновява работата или когато те са замърсени; при наличие на кожни рани те трябва да бъдат покривани с водонепромокаема превръзка.

(2) Забранява се пушенето, плюенето, яденето и пиенето в помещенията, където суровините и продуктите се обработват или съхраняват.

(3) Работодателят взема всички мерки за недопускане на лица, които биха могли да замърсят продуктите, обект на наредбата. Лицата, работещи с продуктите, са здравно освидетелствани при постъпване на работа и се подлагат периодично на медицински преглед.

#### Чл. 13.

(1) Млекопреработвателните предприятия разполагат със следното оборудване:

1. за механично пълнене и автоматично затваряне на опаковките, които се използват за разфасовка на топлинно обработено мляко за пиене и продукти на млечна основа в течна форма, когато такава дейност се извършва;
2. при ограничено производство на течна мляко, предназначено за пиене, НВМС може да разреши прилагане на неавтоматизирани алтернативни методи за пълнене и затваряне, при условие че тези методи дават еднаква гаранция за хигиената;
3. за охлаждане и хладилно съхранение на топлинно обработено мляко, на продукти на база течна мляко, когато такива операции се извършват там; хладилните складове са оборудвани с правилно калибрирана температурно-измервателна апаратура;
4. помещение за складиране и за суровините, предназначени за тяхното производство; когато се използват опаковки за еднократна употреба;
5. склад за опаковки за многократна употреба и оборудване, предназначено за тяхното механично измиване и дезинфекция;
6. резервоари за складиране на сурово мляко, стандартизиращо оборудване и резервоари за съхранение на стандартизирано мляко;
7. центрофуги или други подходящи средства за физическо почистване на млякото, ако е необходимо;
8. оборудване за топлинно третиране, одобрено от НВМС, снабдено със:
  - а) устройство за автоматичен температурен контрол;
  - б) автоматично безопасно устройство, предотвратяващо отиването към съда за задръжка на мляко, което няма необходимата температура;
  - в) подходяща безопасна система, предотвратяваща смесването на пастьоризирано или стерилизирано мляко с ненагрятото мляко;
  - г) автоматично записващо устройство за система за сигурност по буква "в";
9. оборудване за изсушаване и пакетиране на сухо мляко на прах, ако такава технология се провежда в предприятието.

(2) При издаване на разрешителното по чл. 3, ал. 1 НВМС може да одобри различно оборудване, осигуряващо еднаква гаранция по отношение на хигиената.

Чл. 14. Млекопреработвателните предприятия отговарят на следните хигиенни изисквания, отнасящи се до помещенията, оборудването и персонала:

1. не се допуска кръстосано замърсяване (контаминация) в хода на технологичните процеси, вентилацията на въздуха, пакетиращия материал и персонала; помещенията, предназначени за

производствен процес, да бъдат разделени на влажни и сухи зони, всяка от които има собствени условия на работа;

2. възможно най-бързо след всяко пътуване или серия от пътувания, при които има само кратък интервал от време между разтоварването и следващото натоварване, но поне един път на ден контейнерите и цистерните, които се използват за транспортиране на сурово мляко до млекосъбирателните пунктове или до млекопреработвателните предприятия, се почистват и дезинфекцират преди повторна употреба;

3. помещенията за обработка, оборудването, контейнерите и инсталациите, които влизат в контакт с млякото или продуктите на млечна основа или на други бързо развалящи се суровини по време на производството, се почистват и дезинфекцират най-малко един път дневно или в края на всяка работна смяна;

4. (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) собственикът или ръководителят на предприятието определя програма за почистването на оборудването, контейнерите и инсталациите, които влизат в контакт с микробиологично стабилни продукти на млечна основа, и помещенията, в които подобни продукти се поставят, основана на рисковите анализи, съгласно чл. 49, тази програма гарантира, че няма здравен риск за продуктите, обект на наредбата, като резултат от неадекватни методи за почистване.

## Глава трета

### ВETERИНАРНО-САНИТАРНИ И ХИГИЕННИ ИЗИСКВАНИЯ ПРИ ДОБИВА НА СУРОВО МЛЯКО, ПРЕДНАЗНАЧЕНО ЗА ПРИЕМАНЕ В ПРЕДПРИЯТИЯ ЗА ТОПЛИННА ОБРАБОТКА И ПРЕРАБОТКА

#### Чл. 15.

(1) Сурово мляко се добива от животни, които не са заразени от туберкулоза, бруцелоза или други заразни болести, предаващи се на човека чрез млякото.

(2) Не се допуска добив на мляко от животни, страдащи от инфекции на половия и храносмилателния апарат, както и с видими рани и възпаления по вимето.

(3) Не се разрешава млекодайни животни да бъдат третирани с вещества, опасни за здравето на човека, които се отделят чрез млякото, съгласно чл. 50, ал. 1.

(4) За добив на мляко се използват крави, които дават най-малко два литра мляко на ден.

(5) Суровото мляко и млечните продукти не трябва да произхождат от райони, в които е имало заразни заболявания, освен ако не е преминало първоначална пастьоризация (71,7° C за 15 секунди) под контрол на държавен ветеринарен лекар, последвано от едно от следните третираня:

1. втора топлинна обработка, осигуряваща отрицателна реакция на теста за пероксидаза;

2. процедура на сушене, включваща затопляне с ефект, еквивалентен на топлопреработката по т. 1;

3. второ третиране, където рН не се намалява и поддържа по-малко от 6 в продължение на повече от един час.

(6) Когато в едно стопанство се отглеждат различни видове животни, всеки вид трябва да отговаря на здравните изисквания, приложими когато те се държат самостоятелно.

(7) Ако козите, овцете и биволите се отглеждат заедно с крави, те се изследват за туберкулоза.

(8) Суровото мляко се изключва от обработка, преработка, продажба и консумация, ако:

1. е добито от животни, които са третирани с вредни за човека вещества за стимулиране на уговяването и растежа на животните; 2. съдържа остатъци от субстанции по смисъла на чл. 47, които превишават позволеното ниво.

Чл. 16.

(1) Суровото мляко произхожда от стопанства, регистрирани и контролирани от НВМС, които:

1. отговарят на зоохигиенните и ветеринарно-санитарните изисквания;

2. имат помещенията за изолация на животни, които са болни или съмнително болни от заразни заболявания.

(2) (Изм., ДВ, бр. 3 от 2006 г.) Помещенията за доене и първична обработка на млякото, както и помещенията за съхраняване на млякото се разполагат и строят по начин, предотвратяващ всякакъв риск от замърсяване на млякото; те са лесни за почистване и дезинфекция и имат:

1. лесно почистващи се стени и подове;

2. настилка на пода, която улеснява оттичането на течности, средства за изхвърлянето на отпадъци;

3. подходяща вентилация и осветление;

4. (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) подходящ и достатъчен достъп на питейна вода, отговаряща на изискванията на Наредба № 9 от 2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели (ДВ, бр. 30 от 2001 г.), с подходящо налягане и температура, която се използва при доенето и почистването на съоръженията и инструментите, които са в контакт с млякото;

5. добра изолация от всякакви източници на замърсяване;

6. уреди и съоръжения, лесни за измиване, почистване и дезинфекциране.

(3) (Изм., ДВ, бр. 3 от 2006 г.) Помещенията за съхранение на млякото в стопанствата се оборудват с подходящи съоръжения за охлаждане на млякото и са защитени срещу вредители и добре изолирани от всякакви помещения, в които се държат животни.

(4) Ако се използва подвижен доилен апарат, се спазват изискванията по ал. 2, т. 4 и 6 и апаратът:

1. се разполага върху чист под;

2. осигурява защита на млякото през цялото време на доенето;

3. се конструира така, че да позволява поддържането на вътрешните повърхности чисти.

(5) Животните, които се отглеждат на открито, се доят на места и при условия, позволяващи спазването на хигиенните изисквания.

(6) Животните от всички видове не се допускат до помещения и места, където се съхранява, пренася, охлажда или обработва млякото.

Чл. 17.

(1) При доенето се спазват следните хигиенни изисквания:

1. манипулациите при доене се извършват хигиенично;

2. млякото се съхранява в чисти съдове, на чисто място, така че да са изключени всякакви външни влияния върху качеството му; непредаденото в продължение на два часа мляко след приключване на доенето се охлажда при температура 8° С при ежедневното събиране и до 6° С, ако не се събира всеки ден; при транспортиране на млякото до преработвателното предприятие температурата не може да надвишава 10° С.

(2) При производството на някои млечни продукти по технически причини НВМС може да разреши отклонения от температурата по ал.1, т.2 при условие, че крайният продукт отговаря на изискванията за производство на топлинно обработено мляко и млечни продукти.

Чл. 18. Помещенията, съоръженията и инструментите отговарят на следните хигиенни изисквания:

1. технологичното оборудване, инструментите или техните повърхности, които влизат в контакт с млякото, отговарят на изискванията по чл. 8;

2. след употреба съоръженията, използвани за доенето, механичните доилни апарати и цистерни, влизащи в контакт с млякото, се почистват и дезинфекцират;

3. след транспортиране съоръженията се почистват, измиват и дезинфекцират преди последваща употреба.

Чл. 19.

(1) Собствениците и ръководителите на стопанства за добив на мляко осигуряват спазване на следните изисквания към хигиената на персонала:

1. доенето, окачествяването, първичната обработка, съхранението и транспортирането на сурово мляко да се извършват само от лица, които притежават здравна книжка, от която е видно, че са годни да изпълняват тези функции;

2. лицата, извършващи доенето и пренасянето на суровото мляко, се обличат с подходящи чисти дрехи за доене;

3. доячите измиват ръцете си преди започване на доенето и ги поддържат чисти по време на доенето;

4. до мястото на доенето да има подходящи средства за измиване.

(2) Не се допуска контакт с млякото на лица без здравна книжка по ал. 1, т. 1.

Чл. 20.

(1) Собствениците и ръководителите на стопанства за добив на мляко осигуряват въвеждането на програма за предотвратяване добавянето на вода и други несвойствени вещества към суровото мляко под контрола на държавен ветеринарен лекар. Програмата включва редовни проверки по точката на замръзване на млякото от всяко производствено съоръжение в съответствие със следната процедура:

1. суровото мляко от всяко стопанство редовно се проверява чрез произволно взети проби; тези проби се взимат, когато млякото от едно стопанство се доставя директно до млекосъбирателния пункт или когато суровото мляко се събира от стопанството, при условие че са взети предпазни мерки за предотвратяване на фалшификации по време на транспортирането до млекопреработвателното предприятие или преди разтоварването му;

2. при необходимост или съмнителни резултати органите на НВМС взимат оборни проби;

3. когато млякото се доставя от няколко стопанства, пробите могат да се взимат само когато суровото мляко влиза в млекосъбирателния пункт или млекопреработвателното предприятие при условие, че проверките на място са проведени в стопанството;

4. ако резултатите от една проверка водят до съмнение за добавяне на вода или други несвойствени вещества, пробите се взимат във всички стопанства, от които е събрано суровото мляко от източника;

5. ако резултатите от проверката покажат, че не е била добавена вода или други несвойствени вещества, суровото мляко се използва за производство на топлинно обработено мляко или млечни продукти за консумация от хората.

(2) Ръководителят на млекопреработвателното предприятие или негов представител информират НВМС, когато бъдат достигнати максималните фиксирани стойности за общия брой микроорганизми или на соматичните клетки съгласно приложение № 1.

(3) Спазването на показателите, включени в т. 1 - 3 от приложение № 1, се проверява чрез произволни проби при събирането в производственото стопанство или при приемането на суровото мляко в предприятието за обработка или преработка.

(4) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При изследването на сурово мляко се спазват изискванията за:

1. вземане на проби от сурово мляко съгласно метода, посочен в приложение № 4;

2. определяне на точката на замръзване на сурово мляко съгласно метода, посочен в приложение № 5;

3. определяне на общия брой микроорганизми при 30 °C съгласно метода, посочен в приложение № 6;

4. определяне на соматичните клетки съгласно метода, посочен в приложение № 7;

5. доказване на антибиотици и сулфонамиди съгласно метода, посочен в приложение № 8.

(5) (Предишна ал. 4, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Когато максималните стойности съгласно приложение № 3 и стойностите, посочени в т. 1 - 3 от приложение № 1, бъдат превишени и когато последвалото изследване покаже потенциална опасност за здравето, органите на НВМС предприемат съответните мерки.

(6) (Предишна ал. 5, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Ако в рамките на три месеца от обявяването на резултатите от проверките по ал. 1, т. 1 и на проучването по ал. 4 и след като са били превишени стандартите по приложение № 1 млякото от въпросното стопанство не отговаря на тези стандарти, на това стопанство не се разрешава да доставя сурово мляко, докато то не достигне посочените изисквания.

Чл. 21.

(1) На топлинна обработка подлежат:

1. млякото за пиене, добито от животни, контролирани от органите на НВМС;

2. овчето, козето и биволското мляко за търговия.

(2) Добитото мляко от здрави животни, но произхождащи от стада, които не отговарят на изискванията по чл. 16, ал. 1, се използва само за производство на топлинно обработено мляко или за производство на млечни продукти след топлинна обработка под контрол на НВМС.

Чл. 22. Топлинно обработено мляко за пиене се предлага на пазара, ако:

1. е получено от сурово мляко, пречистено или филтрирано в центрофуги или с други подходящи средства съгласно чл. 13, ал. 1, т. 7;

2. отговаря на изискванията по чл. 21;

3. млекосъбирателните пунктове, в които е събирано, отговарят на изискванията по чл. 9 - 12 и 14 или е прехвърляно от една цистерна в друга при добри хигиенни условия;

4. суровото мляко, предназначено за производство на стерилизирано мляко или "УНТ" мляко, се подлага на начална топлинна обработка в предприятие по т. 5;

5. е произведено в предприятие за преработка на мляко, което отговаря на условията по чл. 9 - 12 и 14 и се контролира съгласно чл. 44, 45 и 48;

6. е обработено в съответствие с чл. 27;
7. отговаря на изискванията на приложение № 2;
8. е обозначено, опаковано и маркирано съобразно с глави пета и шеста;
9. е проверено съгласно чл. 47 и 51;
10. е съхранявано и транспортирано в съответствие с глава седма;
11. е придружено от търговски документ с данни за топлинната обработка и от ветеринарния номер на предприятието; този документ се съхранява от получателя не по-малко от 1 година;
12. (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) при кравето мляко точката на замръзване не превишава 0,520° С, относително тегло над 1028 грама на литър, определено за пълномасленото мляко при 20° С, и съдържа минимум 28 грама протеин на литър, получен от умножението на процента на общото съдържание на азот в млякото по 6,38 и сух безмаслен остатък, който е не по-малко от 8,5 %; когато точката на замръзване има стойност по-висока от - 0,520° С и проверките са проведени съгласно чл. 27, тя се приема, ако се докаже, че водното съдържание не е с външен произход.

#### Чл. 23.

(1) Млечни продукти се произвеждат само от сурово мляко, което отговаря на:

1. изискванията по чл. 22 и 27;
2. изискванията на приложение № 1;
3. изискванията по чл. 10, когато е преминало през събирателни пунктове.

(2) Млечните продукти могат да се произвеждат от мляко, предвидено за преработване в продукти, получени от сурово мляко, което отговаря на условията по ал. 1, и е:

1. получено в млекопреработвателно предприятие, което е получило разрешително по чл. 57, т. 8 ЗВМД;
2. складирано и превозено в съответствие с изискванията на глава седма.

(3) Млечни продукти, които не отговарят на изискванията по глава трета, на приложение № 2 или на изискванията за производство на сирене с период на зреене не по-малък от 60 дни, не могат да бъдат предмет на търговия или внос от други страни.

#### Чл. 24.

(1) Млечните продукти трябва да са:

1. получени от мляко или от продукти на млечна основа, отговарящи на изискванията по чл. 23;
2. произведени в млекопреработвателно предприятие, което е получило разрешително по чл. 57, т. 8 ЗВМД;

3. в съответствие на стандартите по приложение № 2;
4. опаковани, пакетирани, маркирани и етикетирани съгласно глави пета и шеста;
5. съхранявани и превозвани в съответствие с глава седма;
6. контролирани в съответствие с чл. 51;
7. подложени на топлинна обработка по време на производствен процес или произведени от продукти след топлинна обработка.

(2) Млечните продукти могат да съдържат съставки, различни от мляко, но годни за консумация от хора.

(3) Забранява се продажбата на мляко и млечни продукти, които са били подложени на йонизиращо облъчване.

Чл. 25. При производство на сирене, включващо период на зреене не по-малък от 60 дни, се допускат отклонения от изискванията по:

1. характеристиките към суровото мляко от приложение № 1;
2. характеристиките на крайния продукт от приложение № 2 и чл. 24, ал. 1, т. 1 и 4; 3. член 13, ал. 1, т. 8.

Чл. 26.

(1) Цистерните, помещенията, инсталациите и оборудването могат да се използват за други хранителни продукти, ако са взети мерки за предотвратяване на риск от контаминиране или разваляне на млякото за пиене и млечните продукти.

(2) Цистерните, използвани за млякото, се обозначават ясно, че се използват единствено за транспорт на хранителни продукти.

(3) Млекопреработвателните предприятия, произвеждащи хранителни продукти със съдържание на мляко или млечни произведения заедно с други съставки, които не са претърпели топлинна или друга обработка с еквивалентен ефект, съхраняват такова мляко, млечни произведения и съставки отделно от млечните продукти.

Глава четвърта

**ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНИ И ХИГИЕННИ ИЗИСКВАНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВОТО НА ТОПЛИННО ОБРАБОТЕНО МЛЯКО ЗА ПИЕНЕ И МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ**

Чл. 27.

(1) При производството на топлинно обработено мляко за пиене задължително се спазват следните изисквания:

1. топлинно обработеното мляко за пиене трябва да бъде получено от сурово мляко, което съответства на изискванията по приложение № 1;
2. след приемането на млякото от млекопреработвателното предприятие то се охлажда до температура не по-висока от 6° С и се съхранява при тази температура до топлинната му обработка, освен ако не е преработено до 4 часа от приемането му; ако суровото краве мляко не е преработено до 36 часа от приемането му, то се изследва преди да бъде топлинно обработено чрез директните и индиректните методи. Ако общият брой колонии при 30° С превишава 300 000 в мл, млякото не се използва за производството на топлинно обработено мляко за пиене.

(2) При производството на топлинно обработено мляко за пиене се вземат всички необходими мерки, включително:

1. произволното вземане на проби за определяне на общия брой колонии чрез културален метод при 30° С, установяващ, че:

а) в суровото краве мляко, необработено до 36 часа след приемането му, общият брой микроорганизми не превишава 300 000 в мл преди топлинното му третиране;

б) в мляко, подложено на първоначална пастьоризация, общият брой колонии не превишава 100 000 в мл преди второто топлинно третиране;

2. преди топлинната обработка млякото, предназначено за пиене, е обект на регулярни проверки за наличие на вода с външен произход чрез криоскопски метод, включващ:

а) резултатите от проверките по чл. 20, ал. 3 и в частност тяхното разнообразие и осреднени резултати;

б) резултатите от съхранението и преработката на млякото според Добрата производствена практика (ДПП), установени чрез криоскопски метод;

в) топлинно обработеното мляко може да е обект на друг тест, който показва микробиологичното състояние на млякото преди топлинната обработка.

(3) Когато с проверка по ал. 2, т. 2 се установи вода с външен произход, НВМС предприема съответни мерки.

Чл. 28.

(1) (Предишен текст на чл. 28, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При производството на пастьоризирано мляко задължително се спазват следните изисквания:

1. то да бъде получено чрез обработка, включваща висока температура за кратко време (поне 71,7° С за 15 сек или друга еквивалентна комбинация), или чрез процес на пастьоризация, включващ различно време и температурни комбинации за получаване на еквивалентен ефект;

2. (изм. и доп., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) млякото да показва негативна реакция на фосфатазен тест и позитивна реакция на пероксидазен тест; при производството на пастьоризирано мляко, което

показва негативна реакция на пероксидазов тест, производителят посочва на етикета, че млякото е произведено като "високотемпературно пастьоризирано"; определянето на фосфатазната активност се извършва съгласно метода, посочен в приложение № 9; пероксидазната активност се определя съгласно метода, посочен в приложение № 10.

3. веднага след пастьоризация да е охладено до температура не по-висока от 6° С.

(2) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При изследване на пастьоризирано мляко се спазват изискванията за:

1. вземане на проби от пастьоризирано мляко съгласно метода, посочен в приложение № 4;
2. определяне на точката на замръзване съгласно метода, посочен в приложение № 5;
3. определяне на общия брой психротрофни микроорганизми при 21 °С и общ брой микроорганизми при 30 °С съгласно методите, посочени съответно в приложения № 11 и № 6;
4. определяне на общия брой колиформи след култивиране при 30 °С съгласно приложение № 12;
5. доказване на антибиотици и сулфонамиди съгласно метода, посочен в приложение № 8;
6. доказване на патогенни микроорганизми съгласно метода, посочен в приложение № 13.

Чл. 29.

(1) (Предишен текст на чл. 29, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При производството на "УНТ" мляко задължително се спазват следните изисквания:

1. то да е получено от сурово мляко, третирано с непрекъснат поток от топлина, позволяващ постигането на висока температура за кратко време (не по-малко от 135° С за не по-малко от 1 сек), с цел унищожаване на всички вегетативни микроорганизми и техните спори, използвайки асептични светлонепропускливи опаковки или такива, които при опаковането са станали светлонепроницаеми, така че непрозрачната опаковка да не променя химическите, физичните и органолептичните качества на млякото;
2. то да бъде запазено по начин, изключващ неговото разваляне, установено чрез термостатна проба, със средствата на внезапните проверки за вземане на проби (15 дни в затворен контейнер при температура 30° С, когато е нужно, контролът може да бъде направен за период от седем дни в затворена опаковка при температура 55° С);
3. когато в процес на третирането му с ултрависока температура е включен директен контакт на млякото и парата (уперизация), парата да е получена от вода за пиене и да не оставя остатъци от чужди вещества в млякото или да го повлиява неблагоприятно; използването на този процес да не причинява каквито и да са изменения във водното съдържание на третираното мляко.

(2) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При изследване на мляко, произведено по УНТ технология, се спазват изискванията за:

1. вземане на проби от мляко, произведено по УНТ технология, съгласно метода, посочен в приложение № 4;
2. определяне на точката на замръзване на мляко, произведено по УНТ технология, съгласно метода, посочен в приложение № 5; 3. определяне на общия брой микроорганизми при 30 °С съгласно метода, посочен в приложение № 6;
4. доказване на антибиотици и сулфонамиди съгласно метода, посочен в приложение № 8.

Чл. 30.

(1) При производството на стерилизираното мляко задължително се спазват следните изисквания:

1. да е затоплено и стерилизирано в херметично затворени опаковки или контейнери, като затварянето е надеждно; 2. млякото да е запазено така, че при произволно вземане на проби да не се наблюдава развалянето му след 15 дни в затворени контейнери при температура 30° С.

(2) Когато е нужно, условието на ал. 1, т. 2 може да бъде изпълнено за период 7 дни при температура 55° С в затворени контейнери.

(3) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При изследване на стерилизирано мляко се спазват изискванията за:

1. вземане на проби от стерилизирано мляко съгласно приложение № 4;
2. определяне на точката на замръзване на стерилизирано мляко съгласно метода, посочен в приложение № 5;
3. определяне на общия брой микроорганизми при 30 °С съгласно метода, посочен в приложение № 6;
4. доказване на антибиотици и сулфонамиди съгласно метода, посочен в приложение № 8.

Чл. 31.

(1) (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Пастьоризираните млека, обект на високотемпературна пастьоризация, "УНТ" и стерилизираното мляко могат да се произвеждат от сурово мляко, преминало топлинна обработка или термизация в друго предприятие; в такъв случай факторът време - температура трябва да бъде по-нисък или еквивалентен на пастьоризацията и млякото да показва позитивна реакция на пероксидазен тест преди вторичното третиране.

(2) Пастьоризираното мляко трябва да бъде произведено при същите условия от сурово мляко, което е преминало само първоначална термизация.

(3) Топлинният процес, температурата и времетраенето на топлообработката при пастьоризирането, "УНТ" и стерилизираното мляко, типовете оборудване за топлинната обработка, клапите за разклоняване на потоците и видовете устройства за контрол и запис на температурата се одобряват от НВМС.

Чл. 32.

(1) Данните, получени от самозаписващи термометри, се подреждат по дати и се пазят в продължение на две години и се показват при поискване от НВМС.

(2) В случай на бързо развалящи се нетрайни продукти периодът по ал.1, с разрешение на орган на НВМС, може да се редуцира на два месеца след минималния срок на годност.

Чл. 33.

(1) Топлинно обработеното мляко за пиене:

1. отговаря на микробиологичните стандарти по приложение № 2;

2. не съдържа фармакологично активни субстанции в количества, по-високи от пределно допустимите стойности.

(2) Патогенните микроорганизми и техните токсини да не присъстват в количества, които увреждат здравето на консуматора. Ако стандартите за тези количества съгласно т. 1 от приложение № 2 са превишени, хранителните продукти се изключват от употреба и се снемат от пазара.

(3) При всички случаи, когато стандарти по т. 2 от приложение № 2 са превишени, се провежда проверка по въвеждането на методите за мониторинг и проверка на критичните точки, приложени в производствените предприятия. Информация за всички корективни процедури, включени в мониторинга на производството, се изпраща в НВМС, за да се избегне повторение на грешките

(4) Винаги, когато стандартът М (т. 2 от приложение № 2) е превишен при сирене, произведено от сурово мляко и от терминирано мляко, или меко сирене, тестирането се провежда за наличие на щамове от ентеротоксични *S. aureus* или *E. coli*, които са считани за патогенни, и също, ако е необходимо за вероятното наличие на стафилококови токсини в такива продукти чрез научно обосновани методи. Ако се идентифицират посочените щамове и/или се намерят стафилококовите ентеротоксини, произведените партиди се изтеглят от пазара, като се информира НВМС за предприетите действия по тяхното изтегляне и корективните процедури, приложени в производствената мониторинг система.

Чл. 34.

(1) Собственикът или ръководителят на млекопреработвателното предприятие предприема всички необходими мерки, за да гарантира, че:

1. суровото мляко, предназначено за производство на млечни продукти, е топлинно обработено;

2. при производство на традиционни млечни продукти, характерни за определен географски район, произведени от сурово мляко, то е използвано в производството в рамките на 36 часа от

добива, ако е съхранявано при температура 6° С, или в рамките на 48 часа - ако е съхранявано при температура 4° С от добива; суровото мляко, използвано за производството на тези продукти, отговаря на изискванията по приложение № 1.

(2) Поради технически причини при производството на определен тип млечни продукти НВМС може да въведе времетраене и температури по ал. 1, които да бъдат превишени.

(3) Топлинно обработеното мляко предназначено за производството на млечни продукти, се получава от сурово мляко, което отговаря на стандартите по приложение № 1 и на изискванията на приложение № 3 по време на гратисния период.

(4) Топлинно обработеното термизирано мляко отговаря на следните изисквания: 1. получено е от сурово мляко, което ако не е обработено в рамките на 36 часа от приемането му в млекопреработвателното предприятие, не надхвърля 300 000 броя микроорганизми за мл при кравето мляко; 2. ако се използва за производство на пастьоризирано, "УНТ" или стерилизирано мляко, преди третирането му да има общ брой микроорганизми при 30° С, равен или по-малък от 100 000 за мл.

(5) Топлинно обработеното пастьоризирано мляко отговаря на следните изисквания:

1. получено е чрез средствата за третиране, включващи висока температура за кратко време (поне 71,7° С за 15 сек или каквато и да е друга еквивалентна комбинация), или пастьоризация, използваща различно време и температурна комбинация, за да се получи еквивалентен ефект;

2. (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) показва отрицателна реакция на фосфатазен тест и положителна реакция на пероксидазен тест; пастьоризирано мляко, което показва негативна реакция на пероксидазов тест, се означава като "висока температурна пастьоризация".

(6) "УНТ" млякото се получава с прилагане върху суровото мляко на постоянен приток на топлина, водеща със себе си висока температура за кратко време (не по-малка от 135° С за не по-малко от една секунда), необходима да унищожи всички увреждащи млякото микроорганизми и техните спори, така че химическите, физическите и органолептичните изменения да са минимални.

Глава пета

ОПАКОВАНЕ И ПАКЕТИРАНЕ

(Загл. изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Чл. 35.

(1) Опаковането се извършва при хигиенни условия в места, определени за тази цел.

(2) Бутилирането, пълненето на опаковки с топлинно обработено мляко и течни млечни продукти, запечатването на опаковките и опаковането им да бъде извършено автоматично. Когато производството е ограничено, НВМС може да разреши неавтоматични методи за затваряне, осигуряващи същата сигурност по отношение на хигиената.

(3) Опаковката или амбалажът не може да се използва повторно за продукти по наредбата с изключение на определени типове опаковки след щателно измиване и дезинфекция.

(4) Опаковката се затваря в млекопреработвателните предприятия, в които е била извършена последната топлинна обработка на млякото за пиене и/или млечните продукти в течна форма, веднага след напълването по начин, гарантиращ, че млякото е предпазено от странични въздействия от външен произход при запазване на неговите характеристики. Затварящата система се проектира по начин, осигуряващ видимо доказателство, ако опаковката е била отваряна.

(5) Производството на продукта и опаковането могат да се осъществяват в едно помещение в съответствие с ал. 1, ако при операциите по ал. 2 се спазват следните условия:

1. помещението е достатъчно просторно и оборудвано, за да осигури хигиената на провежданите операции;
2. обвивният и опаковъчният материал са внесени в млекопреработвателното предприятие с покрития за предпазването им от повреди по време на транспорта и са складирани при хигиенни условия в помещения, предназначени за тази цел;
3. в помещенията за складиране на опаковъчния материал не се допускат прах, вредители и са отделени от помещенията, съдържащи субстанции, които могат да замърсят продуктите; пакетиращият материал не се поставя директно на пода;
4. опаковъчният материал се сглобява при хигиенни условия, преди да се внесе в помещението; отклонение от това изискване се допуска в случай на автоматично сглобяване на пакетите, осигуряващо липса на риск от контаминация на продукта;
5. опаковките се внасят в помещението при хигиенни условия и се използват веднага; те не могат да се подготвят от персонал, работещ с неопаковани продукти;
6. веднага след опаковането продуктите се поставят в складовото помещение.

Чл. 36. Собственикът или ръководителят на млекопреработвателно предприятие за целите по контрола осигурява поставянето върху опаковката на топлинно обработено мляко и млечни продукти в течна форма на следната информация в допълнение на информацията по глава шеста:

1. вид на топлинната обработка, която млякото е преминало;
2. информация за датата на последната топлинна обработка;
3. при пастьоризираното мляко - температурата, при която трябва да се съхранява.

Глава шеста

УСЛОВИЯ ЗА ЗДРАВНА МАРКИРОВКА И ЕТИКЕТИРАНЕ

Чл. 37.

(1) (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Продуктите по чл. 1, т. 1 носят здравна маркировка.

(2) Маркирането се извършва по време или веднага след производството в млекопреработвателното предприятие на ясно видимо място.

(3) Здравната маркировка трябва да бъде четлива, неделима, нейните характеристики - лесно определими, и се поставя: 1. върху опаковката на продукта, ако продуктът е индивидуално опакован, или на етикета, ако е поставен на опаковката; 2. на общата обвивка, ако продуктите са опаковани индивидуално и след това пакетирани заедно и така доставени до потребителя. (4) Когато продуктите, маркирани в съответствие с ал. 1 - 3, са последователно опаковани в големи опаковки, здравната маркировка се поставя също и върху тях.

(5) (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Здравната маркировка съдържа следната информация в елипсовидно оформление, като буквите и цифрите са с височина 0,2 см: 1. инициалите с главни букви "BG" - върху горната част на опаковката; 2. ветеринарен регистрационен номер на млекопреработвателното предприятие, когато е нужно на преопаковъчния център или хладилника - в центъра на опаковката.

(6) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Здравната маркировка на предприятия по чл. 43, ал. 4 съдържа данните по ал. 5 без инициалите "BG" и е с кръгла форма.

(7) (Предишна ал. 6, изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Върху големи опаковки се поставя елипсовиден печат с широчина 6,5 см и височина 4,5 см, включващ информацията по ал. 5, като буквите са с широчина 0,8 см и цифрите са с височина 1 см. Здравният печат може да включва и името на ветеринарния лекар, извършил маркирането.

(8) (Предишна ал. 7, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Здравната маркировка се полага на продукта, обвивката и опаковката с мастилен печат или щампована.

(9) (Предишна ал. 8, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Здравната маркировка може да се състои от неподвижна поставка от резистентен материал, отговарящ на всички хигиенни изисквания, и носеща информацията по ал. 5.

(10) (Предишна ал. 9, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Информацията, съдържаща се в здравната маркировка, се указва и в съпровождащите пратката търговски документи.

Чл. 38.

(1) (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Етикетирането на продуктите по чл. 1, т. 1 се извършва при условията и по реда на Наредбата за етикетирането и представянето на храните (приета с ПМС № 136 от 2000 г., ДВ, бр. 62 от 2000 г.).

(2) (Предишен текст на чл. 38, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Етикетирането се поставя за целите на инспекцията и съдържа:

1. думите "сурово мляко" - за сурово мляко, предназначено за директна консумация от хората;
2. думите "приготвено със сурово мляко" - за продукти на млечна основа, произведени от сурово мляко, чийто производствен процес не включва топлинна обработка, включително термизация;
3. за други млечни продукти - типа на топлинната преработка, приложена в края на производствения процес;

4. за млечни продукти, в които се среща развитие на микроорганизми - срока на годност или поне дата, до която са годни за консумация.

## Глава седма

### ИЗИСКВАНИЯ ЗА СЪХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТ

#### Чл. 39.

(1) Продуктите по чл. 1, т. 1, които не могат да бъдат складирани при стайна температура, се складират при температури, определени от производителя, осигуряващи тяхната трайност.

(2) Максималната температура, при която пастьоризираното мляко се съхранява до напускане на предприятието и по време на транспорта, е 6° С.

(3) Цистерните, бутилките и други контейнери, които се използват за транспорт на пастьоризирано мляко, отговарят на следните хигиенни изисквания:

1. вътрешната им повърхност и всички части, които могат да са в контакт с млякото, са направени от гладък материал, лесен за почистване, измиване и дезинфекция, устойчив на корозия и неподаващ субстанции на млякото, в такива количества, които да повлияват на здравето на хората, повреждат състава на млякото или променят неговите органолептични характеристики;

2. да са конструирани по такъв начин, че млякото да се източва напълно и ако са затворени с кранове, лесно да се демонтират, измиват, изчистват и дезинфекцират;

3. да се подлагат на измиване, почистване и дезинфекция веднага след всяко използване и ако е необходимо - преди всяка употреба; почистването и дезинфекцията се провеждат в съответствие с чл. 14, т. 2;

4. да са херметически затворени преди и по време на транспорта с водонепропускливи затварящи се устройства.

(4) Транспортните средства и контейнерите за транспортиране на пастьоризирано мляко са проектирани и оборудвани по такъв начин, че изискваните температури да се поддържат през времето на транспорта.

(5) Транспортните средства или бутилки са в добро състояние. Те могат да се използват за транспорт и на други продукти или обекти, които не причиняват влошаване качествата на млякото. Техните вътрешни повърхности са гладки и лесно се измиват, почистват и дезинфекцират. Вътрешността на превозните средства, предназначени за транспорт на топлинно обработено мляко в малки опаковки или бутилки, е проектирана така, че предпазва опаковките от замърсяване и атмосферни влияния. Те не могат да бъдат използвани за транспорт на животни.

#### Чл. 40.

(1) Националната ветеринарномедицинска служба редовно проверява съответствието на средствата за транспорт и условията на товарене с изискванията на наредбата.

(2) Националната ветеринарномедицинска служба може да допусне отклонения от тези изисквания за времето на транспортиране само за доставки на дребно и да въведе отклонение от +2° С.

#### Глава осма

### ЗАДЪЛЖЕНИЯ НА НАЦИОНАЛНАТА РЕФЕРЕНТНА ЛАБОРАТОРИЯ ЗА АНАЛИЗИ И ПРОВЕРКА НА КАЧЕСТВОТО, БЕЗВРЕДНОСТТА И БЕЗОПАСНОСТТА НА МЛЯКОТО И МЛЕЧНИТЕ ПРОДУКТИ

(Загл. изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

#### Чл. 41.

(1) (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Националната референтна лаборатория за анализи и проверка на състава, качеството и безвредността на млякото и млечните продукти се определя по реда на чл. 14, ал. 3 ЗВМД. Тези лаборатория:

1. координира дейността на акредитирани лаборатории за анализи за качеството, безвредността и безопасността на млякото и млечните продукти;
2. подпомага НВМС в организирането и въвеждането на системи за контрол на качеството при производството на млякото и млечните продукти;
3. периодично организира сравнителни изпитвания между тях.

(2) (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Националната ветеринарномедицинска служба води списък на националната референтна лаборатория, който се предоставя при поискване на други страни.

#### Чл. 42.

(1) Ръководителите на лабораториите по чл. 41 са длъжни да:

1. дават на акредитираните лаборатории методите и да организират сравнителни тестове, както и да информират акредитираните лаборатории за напредъка в тази област;
2. провеждат курсове за обучение на персонала от акредитираните лаборатории;
3. оказват научна и техническа помощ на НВМС, особено в случаите, когато резултатите от изследването са спорни;
4. гарантират, че персоналот им ще пази тайна за някои цели, резултати или връзки.

(2) Националната референтна лаборатория осигурява изпълнението на следните условия:

1. има подходящ квалифициран персонал с достатъчно опит в техническото прилагане на анализите и тестовете за мляко и млечни продукти, както и с достатъчно познания за международните стандарти и практика;
2. притежава съоръжения и химикали, които са необходими за задачите по ал. 1;
3. има подходяща административна структура и инфраструктура;
4. има наличен, ако е необходимо, актуализиран списък на одобрените и използваните субстанции и химикали и актуализиран списък на техните производители и доставчици.

## Глава девета

### КОНТРОЛНА ДЕЙНОСТ

#### Чл. 43.

(1) Националната ветеринарномедицинска служба издава разрешително по чл.57, т. 8 ЗВМД и води регистър на:

1. млекосъбирателните пунктове;
2. млекопреработвателните предприятия;
3. (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) препакетиращи цехове;
4. складовете за съхранение на млечни продукти.

(2) На обекти, получили разрешително по ал. 1, се дава ветеринарен регистрационен номер.

(3) Регистърът на обектите по ал. 1 при поискване се предоставя от НВМС на други държави.

(4) (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) За предприятия с капацитет на производство до един тон дневно не се прилагат изискванията по:

1. чл. 9, т. 12 - относно самостоятелни съблекални;
2. чл. 13, ал. 1, т. 4 и 8 - относно отделни помещения за приемане и пастьоризиране на млякото;
3. чл. 13, ал. 1, т. 8, букви "б" и "в".

#### Чл. 44.

(1) Националната ветеринарномедицинска служба осъществява контрол в обектите по чл. 43, ал. 1 за спазване изискванията за добри производствени практики.

(2) При констатиране на нарушения на хигиенните изисквания в производствения процес или затруднения при провеждане на проверката органите на НВМС предприемат мерките по чл.59 ЗВМД.

(3) При издаване на предписания НВМС се съобразява и със заключенията на експерти от други страни във връзка с търговията с тях.

Чл. 45.

(1) Проверките и контролът върху обектите по чл. 43, ал. 1 се извършват от НВМС при спазване изискванията от глава десета.

(2) Честотата на проверките и контролът зависят от големината на обектите по чл. 43, от вида на произвеждания и съхраняван продукт, от преценката за степента на риска, както и от предоставените гаранции по извършвания самоконтрол съгласно чл. 49.

Чл. 46. Собствениците и ръководителите на обектите по чл. 43, ал. 1 са длъжни да осигурят на държавния ветеринарен лекар свободен достъп за проверките и контрола на всички етапи от производството и съхранението на продуктите, както и до финансовите документи на предприятието.

Чл. 47.

(1) Националната ветеринарномедицинска служба редовно анализира резултатите от направените изследвания по чл. 49. Тя може да предприеме и други мерки по нейна преценка, свързани с проверките и контрола на всички етапи от производството на продуктите.

(2) За резултатите от проверките и анализите НВМС писмено уведомява собствениците или ръководителите на обектите по чл. 43, ал. 1.

Чл. 48. Националната ветеринарномедицинска служба извършва контрол на животните от производствените ферми за спазване на изискванията по чл. 15 - 20.

Чл. 49. Собственикът и ръководителят на предприятието вземат всички необходими мерки за гарантиране на контрола на всеки етап от производствения процес на продукта, като:

1. проверяват инвентара, съоръженията и машините на всички етапи на производство на продукта;
2. определят критичните точки на базата на производствения процес;
3. осигуряват постоянното им наблюдение и контрол чрез подходящи методи;
4. изпращат проби за анализи в одобрени от НВМС лаборатории;

5. съхраняват резултатите от проверките или тестовете в писмена или регистрирана форма най-малко 2 г.; за млечни продукти, които не са съхранявани при обичайната температура, този период е 2 месеца след изтичане срока на годност;
6. информират незабавно НВМС при резултати от лабораторни изследвания с данни за риск за здравето на хората;
7. в случай на внезапен риск за здравето на хората изтеглят от пазара млечните продукти; тези продукти остават под възбрана от държавен ветеринарен лекар, докато не бъдат унищожени, използвани за други цели без консумация от хора или бъдат преработени по начин, гарантиращ тяхната безопасност;
8. контролират изтеглените продукти до тяхното унищожаване под контрола на държавен ветеринарен лекар или ги преработват след разрешение от НВМС;
9. гарантират точното полагане на здравната маркировка;
10. собственикът или управителят въвежда програма за запознаване и обучение на персонала с изискванията за хигиенно производство, адаптирано с производствената структура; държавният ветеринарен лекар участва в създаването и прилагането на програмите за обучение.

#### Чл. 50.

- (1) Суровото мляко, топлинно обработеното мляко и млечните продукти се контролират от НВМС с мониторингови програми за наличие на остатъци от лекарствени средства, консервиращи вещества и замърсители от околната среда.
- (2) Изследванията се провеждат по научно доказани методи, утвърдени международно или от законодателството на Европейския съюз. Референтните методи за изследване и допустимите нива на субстанциите се одобряват от НВМС.
- (3) Не се допускат за консумация от хора мляко и млечни продукти с наличие над пределно допустимите стойности на остатъци от лекарствени средства, консервиращи вещества, замърсители от околната среда и други субстанции, опасни или вредни за човешкото здраве или променящи органолептичните качества на млякото и млечните продукти.
- (4) Националната ветеринарномедицинска служба осъществява контрол за съответствие с изискванията и разработва подробна схема за извършване на проверките на място по мониторинга съгласно ал. 1, която включва:
  1. честотата за провеждане на проверките по мониторинга;
  2. методите и пределно допустимите концентрации на изследваните субстанции.
- (5) Генералният директор на НВМС със заповед може да разшири списъка по ал. 1.

Чл. 51. Националната ветеринарномедицинска служба извършва контрол и на млечни суровини, влагани в продукти с друг основен състав.

Глава десета

#### ЗДРАВНИ ПРОВЕРКИ И НАДЗОР НА ПРОИЗВОДСТВОТО

Чл. 52. Контролът за спазване изискванията на наредбата се осъществява от НВМС в предприятията и включва:

1. контрол върху:

- а) чистотата на помещенията, оборудването и хигиената на персонала;
  - б) ефикасността от проверките, проведени от предприятията, особено чрез анализ на резултатите и вземането на проби;
  - в) микробиалните и хигиенните условия за производството на млечните продукти;
  - г) ефикасността на обработката на млечните продукти и топлинно обработеното мляко за пиене;
  - д) херметичното затваряне на опаковките със средствата на произволно вземане на проби;
  - е) съответната здравна маркировка на млечните продукти;
  - ж) условия за складиране и транспорт;
2. вземане на всички проби, необходими за лабораторна диагностика;
3. провеждане на други проверки, считани за необходими.

Глава единадесета

#### ВETERИНАРНО-САНИТАРНИ ИЗИСКВАНИЯ ПРИ ВНОС

(Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Чл. 53 - 54. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.).

#### ДОПЪЛНИТЕЛНА РАЗПОРЕДБА

§ 1. По смисъла на тази наредба:

1. "Сурово мляко" е мляко, добито от секрецията на млечните жлези на една или повече крави, овце, кози и биволици, което не е загрявано над 40° С или не е било подложено на обработка, която има подобен ефект.

2. "Мляко за производство на продукти на млечна основа" е сурово мляко за преработване, течено или замразено мляко, получени от сурово мляко, подложено или не на разрешена физическа обработка, като топлинна обработка или термична обработка, или мляко с изменен състав, при което тези промени се ограничават до добавяне и/или отстраняване на натурални съставки на млякото.
3. "Топлинно обработено мляко за пиене" е мляко, предназначено за продажба на крайния консуматор и на институции, получено чрез топлинна обработка, или пастьоризирано мляко за продажба наливно по желание на крайния потребител.
4. "Продукти на млечна основа" са млечни продукти, получени изключително от мляко, като се приеме, че необходимите за тяхното производство съставки могат да се добавят. Тези съставки не се използват като заместители на част от млечните съставки или всички такива и комбинирани млечни продукти, в които няма заменена съставка или има намерение да бъде заменена някоя млечна съставка и в която млякото или млечният продукт е основна част от гледна точка на количеството или характеристиката на продукта.
5. "Топлинна обработка" е всякаква обработка, включваща загряване, която предизвиква отрицателна реакция на фосфатазен тест.
6. "Термизация" е нагряване на суровото мляко между 57 и 68° С за 15 секунди, така че след обработката млякото да покаже положителен фосфатазен тест.
7. "Производствена ферма" е ферма, в която се отглеждат една или повече млекодайна крави, овце, кози или биволици.
8. (Изм., ДВ, бр. 3 от 2006 г.) "Млекосъбирателен пункт" е място, където се събира, прецежда и охлажда суровото мляко от повече от едно млекодобивно стопанство.
9. "Млекопреработвателно предприятие" е предприятие, където суровото мляко е подложено на топлинна обработка и продуктите на млечна основа се обработват, преработват и опаковат.
10. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.).
11. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) "Опаковане" е операция, предназначена да предпази млечните продукти от заразяване чрез използване на първоначална опаковка или първоначален контейнер.
12. "Херметически затворена опаковка" е опаковка, която е затворена с цел да осигури защитата на съдържанието от проникване на микроорганизми по време и след топлинната обработка и която е херметична.
13. "Пласиране на пазара" е съхраняването или излагането на показ с оглед продажба, офериране за продажба, доставка или какъвто и да е друг начин с изключение на продажбата на дребно.
14. "Оборна проба" е пробата, представляваща млякото от едно напълно контролирано сутрешно или вечерно доене, започващо не по-рано от единайсет часа или повече от тринайсет часа след предходното доене.
15. "Добри производствени практики" (ДПП) са системи от основни правила, които трябва да се спазват при производството на храни и които са свързани с производство на суровини, персонал,

помещения, съоръжения, материали, състояние на изходни суровини, документация, хигиенно поддържане, технология на производствените системи за контрол с цел да се сведе до минимум рискът от замърсяване на храните чрез производствена или човешка дейност.

16. "Мониторингови програми" се осъществяват с цел въвеждане на ефикасна и единна система за контрол върху използването на непозволени вещества и следене на определен брой остатъци от фармакологично активни субстанции и замърсители на околната среда, разглеждане и разкриване на причините за тяхното наличие в суровините и продуктите от животински произход.

17. "Акредитирана лаборатория" е такава, която притежава сертификат от Българската служба по акредитация (БСА) и отговаря на изискванията на БДС EN 45001.

18. "Оторизирана или референтна лаборатория" е такава, която е одобрена със заповед на министъра на земеделието и горите по предложение на НВМС.

19. (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) "Пакетиране" е поставянето на един или повече опаковани или неопаковани продукти във втори контейнер.

20. (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) "Материал за пакетиране" е вторият контейнер, в който се поставят опакованите продукти.

21. (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) "Опаковка" е използваният материал за опаковане или контейнер, когато са в пряк контакт с продуктите.

22. (Нова, ДВ, бр. 111 от 2002 г.) "Първичен анализ" е изследване на суровото мляко в млекосъбирателния пункт в присъствието на представител на млекопреработвателното предприятие.

#### ПРЕХОДНИ И ЗАКЛЮЧИТЕЛНИ РАЗПОРЕДБИ

##### § 2. (Изм., ДВ, бр. 9 от 2006 г.)

(1) Предприятията, получили ветеринарномедицинско разрешително за дейност по реда чл.92 ППЗВД, които имат одобрени бизнес планове и до 12.XII.2005 г. са завършили напълно предвидените в тях строително-монтажни работи и 80% от необходимото оборудване е функциониращо, се привеждат в съответствие с изискванията на тази наредба в срок до 31.III.2006 г.

(2) Собствениците на предприятия по ал. 2 в срок до 15.II.2006 г. представят за одобрение от инспектора от ДВСК, контролиращ предприятието, проект на допълнение към бизнес плановете си.

(3) Допълнението към съществуващия бизнес план се одобрява в срок до 20.II.2006 г. и включва всички изисквания на тази наредба, на които съответното предприятие не отговаря, и сроковете за изпълнението им, като крайният срок за привеждане на предприятието с изискванията по тази наредба е 31.III.2006 г.

(4) Допълнение към бизнес план не се одобрява за предприятия, които не са получили ветеринарномедицинско разрешително за дейност по реда на чл.92 ППЗВД и/или не са

завършили всичките строително-монтажни работи, и/или са изпълнили по-малко от 80 % от предвиденото в бизнес плана функциониращо оборудване.

(5) За предприятия, които нямат одобрено допълнение към съществуващия бизнес план, се прилагат мерките по чл.59, ал. 1, т. 4 ЗВД.

§ 3. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

(1) Суровото мляко, което се добива в стопанства, отговарящи на изискванията по чл. 16 - 20, трябва да отговаря на показателите общ брой микроорганизми (ОБМ) и общ брой соматични клетки (ОБСК), определени по количества и периоди, както следва:

1. през периода 2002 до 31.XII.2005 г. - на показателите ОБМ и ОБСК, посочени в приложение № 3 от Наредба № 30 за ветеринарно-санитарните и хигиенните изисквания при добива на сурово мляко, изграждане и експлоатация на млекопреработвателни предприятия, производството и търговията с топлинно обработено мляко и млечни продукти, както следва:

а) първо качество краве мляко - до 500 000/мл ОБМ и ОБСК;

б) първо качество овче и козе мляко - до 1 500 000/мл ОБМ;

в) първо качество биволско мляко - до 1 000 000/мл ОБМ и до 500 000/мл ОБСК;

2. през периода от 1.I.2006 г. до 31.XII.2007 г. - на следните показатели:

а) екстра качество краве мляко - до 300 000/мл ОБМ и до 400 000/мл ОБСК;

б) първо качество овче и козе мляко - до 1 500 000/мл ОБМ;

в) първо качество биволско мляко - до 1 000 000/мл ОБМ и до 500 000/мл ОБСК;

3. през периода от 1.I.2008 г. до 31.XII.2009 г. - на изискванията за ОБМ и ОБСК, които са по-ниски от равнищата за 2006 - 2007 г., за да могат да достигнат изискванията на приложение № 1 към чл. 23 през 2009 г.:

а) сурово краве мляко - до 100 000/мл ОБМ и до 400 000/мл ОБСК;

б) сурово овче и козе мляко - до 1 500 000/мл ОБМ;

в) сурово биволско мляко - до 1 000 000/мл ОБМ и до 500 000/мл ОБСК.

(2) Продуктите, произведени до 2009 г. от мляко, което не отговаря на показателите за ОБМ и ОБСК по ал. 1, се маркират със здравната маркировка по чл. 37, ал. 6 и могат да се предлагат само на пазара в страната.

§ 4. (Нов, ДВ, бр. 97 от 2004 г.; изм., бр. 3 от 2006 г., бр. 15 от 2006 г.) Член 37, ал. 6 и чл. 43, ал. 4 се прилагат до 31.XII.2005 г. за всички предприятия.

§ 5. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.; предишен § 4, бр. 97 от 2004 г.) Наредбата се издава на основание чл.60 от Закона за ветеринарномедицинската дейност и отменя Наредба № 29 от 1995 г. за ветеринарно-санитарните и хигиенните изисквания при изграждане и експлоатация на млекопреработвателни предприятия (ДВ, бр. 106 от 1995 г.) и Наредба № 3 от 1998 г. за добив, изкупуване и окачествяване на сурово мляко (ДВ, бр. 12 от 1998 г.).

§ 6. (Предишен § 5, бр. 97 от 2004 г.) Изпълнението на тази наредба се възлага на генералния директор на НВМС.

#### Приложение № 1

към чл. 23

(Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Изисквания, които трябва да бъдат спазвани при събирането на сурово мляко

##### 1. Сурово краве мляко:

1.1. Провежда се изследване на представителна проба от суровото мляко, взета от всяко производствено стопанство:

(а) средногеометрично за период два месеца с най-малко две проби на месец;

(б) средногеометрично за период три месеца с най-малко една проба на месец; когато клетъчните елементи варират значително според сезона, на млекопроизводителите може да бъде разрешено съответно да прилагат различен метод на изчисляване на резултатите в периода на ниска лактация.

1.2. Суровото краве мляко, предназначено за производство на топлиннообработено мляко за пиене, ферментирало мляко, подсладена извара с каймак, желирано или ароматизирано мляко и сметана, трябва да отговаря на следните стандарти:

брой на колонии при 30° С (за мл) < 100 000 (а)

брой на соматичните клетки (за мл) < 400 000 (б)

1.3. Суровото краве мляко за производство на млечни продукти, различни от тези, споменати в т. 1, трябва да отговаря на следните стандарти:

брой на колонии при 30° С (за мл) < 100 000 (а)

брой на соматичните клетки (за мл) < 400 000 (б)

1.4. Суровото краве мляко, предназначено за производство на продукти, чийто производствен процес не включва топлинна обработка, трябва: (а) да отговаря на стандартите от т. 1; (б) освен това да отговаря на следния стандарт (1):

*Staphylococcus aureus* (за мл):  $n = 5$

$m = 500$

$M = 2000$

$c = 2,$

(1) където:  $n$  е броят на отделните проби, които се съдържат в пробата;  $m$  - прагова стойност за броя бактерии; резултатът е задоволителен, когато броят бактерии във всички единици от пробата не превишава " $m$ ";  $M$  - максимална стойност за броя бактерии; резултатът трябва да се счита незадоволителен, ако броят на бактериите в една или повече единици проба е " $M$ " или повече;  $c$  - броят единици проба, когато броят на бактериите може да бъде между " $m$ " и " $M$ "; пробата се счита приемлива, ако броят на бактериите на другите единици проба е " $m$ " или по-малко.

2. Сурово биволско мляко: За спазването на тези стандарти се провежда изследване на представителна проба от суровото мляко, взета от всяко производствено стопанство:

(а) средногеометрично за период два месеца с най-малко две проби на месец.

(б) средногеометрично за период три месеца с най-малко една проба на месец.

2.1. Суровото биволско мляко за производство на млечни продукти трябва да отговаря на следните стандарти:

брой на колонии при 30° C (за мл) < 1 000 000 (а)

брой на соматичните клетки (за мл) < 500 000 (б)

2.2. Суровото биволско мляко, предназначено за производство на продукти, чийто производствен процес не включва никаква топлинна обработка, трябва да отговаря на следните изисквания:

брой на колонии при 30° C (за мл) < или = 500 000

брой на соматичните клетки (за мл) < или = 400 000

*Staphylococcus aureus* както при кравето мляко.

3. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Суровото козе, овче мляко трябва да отговаря на следните стандарти:

3.1. ако е предназначено за производство на топлообработено мляко за пиене или продукти с топлообработено мляко:

брой на колонииите при 30° C (за мл) < или = 1 500 000; 3.2. ако е предназначено за производство на продукти, произведени със сурово мляко чрез процес, при който не се изисква топлинна обработка:

брой на колонииите при 30° C (за мл) < или = 500 000.

Приложение № 2

към чл. 33

(Изм. и доп., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Микробиологични критерии за определени млечни продукти след тяхното производство в млекопреработвателните предприятия

1. Задължителни критерии: патогенни микроорганизми

Вид микроорганизми	Продукт	Стандарт
--------------------	---------	----------

(мл, г) (а)

Листерия

моноцитогенес	сирена, различни
---------------	------------------

от твърдите сирена

други продукти	отсъстват в 25 г (с)
----------------	----------------------

n=5, c=0

отсъстват в 1 г

Салмонела	всички продукти
-----------	-----------------

освен мляко на прах

мляко на прах

отсъстват в 25 г

n=5, c=0

отсъстват в 25 г (с)

n=10, c=0

Патогенните микроорганизми и техните токсини не трябва да присъстват в количества, които повлияват на здравето на консуматора, където:

а)  $n$  = брой на отделните проби, които се съдържат в пробата;  $m$  = прагова стойност за броя бактерии; резултатът е задоволителен, когато броят бактерии във всички единици от пробата не превишава " $m$ ";  $M$  = максимална стойност за броя бактерии; резултатът трябва да се счита незадоволителен, ако броят на бактериите в една или повече единици проба е " $M$ " или повече;  $c$  = броят единици проба, когато броят на бактериите може да бъде между " $m$ " и " $M$ "; пробата се счита приемлива, ако броят на бактериите на другите единици проба е " $m$ " или по-малко;

б) изследването не е задължително за стерилизирано мляко и млечни продукти, където топлинната обработка се прилага след обвиването или пакетирането;

в) (изм. и доп., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) двадесет и пет грамове проби се състоят от пет вземания (единици) от по пет грама, взети от различни части на продукта. Когато тези стандарти са превишени, храните не се използват за човешка консумация и се изтеглят от пазара съгласно чл. 49, т. 6 и 7. Програмите за вземане на проби се съставят в зависимост от вида на продукта и анализа на риска.

## 2. Аналитични критерии: организми, показващи лоша хигиена

Вид микро-

организми      Продукт      Стандарт (мл, г) (а)

Стафилококус ауреус      сирена, произведени

от сурови млека и от

терминизирано мляко  $m = 1000$

$M = 10000$

$n = 5$

$c = 2$

меки сирена

(произведени от

топлинно обра-

ботено мляко)

прясно сирене,

мляко на прах,

замразени млечни

продукти (вкл. сладолед)       $m = 100$

$M = 1000$

$n = 5$

$c = 2$

$m = 10$

$M = 100$

$n = 5$

$c = 2$

саламурени сирена, парени сирена  $m = 10$

$M = 100$

$n = 5$

$c = 2$

Йогурт  $m = 0$

$M = 10$

$n = 5$

$c = 2$

Е. коли сирена, произведени от

сурови млека и от

терминизирано мляко  $m = 10000$

$M = 100000$

$n = 5$

$c = 2$

меки сирена (произведе-

ни от топлинно обрабо-

тено мляко)  $m = 100$

$M = 1000$

$n = 5$

$c = 2$

саламурени сирена, парени сирена  $m = 10$

$M = 100$

$n = 5$

c = 2

йогурт m = 0

M = 10

n = 5

c = 2

(Доп., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Във всички случаи, когато тези стандарти са превишени, се проверява изпълнението на методите за мониторинг и критичните точки, прилагани в преработвателното предприятие съгласно чл. 49. Органите на НВМС се информират за корективните процедури, включени в мониторинговата програма на производството за предпазване от повторно превишаване на стандартите. Когато стандартът М е превишен - за сирене от сурово, термизирано мляко и меко сирене, се извършва изследване за вероятно наличие на ентеротоксигенни щамове на *S. Aureus* или *E. Coli*, за които се предполага, че са патогенни, и когато е необходимо - за наличие на токсини на стафилококи в такива продукти. Когато се установят посочените щамове и/или стафилококови ентеротоксини, всички партиди, в които са установени, се изтеглят от пазара. В този случай органите на НВМС се информират за измененията съгласно чл. 49, т. 6 за предприетите действия за изтегляне на съмнителните пратки и корективните процедури, включени в производствената мониторингова програма.

### 3. Индикаторни организми: основни насоки

Вид микро-

организми	Продукт	Стандарт (мл, г) (а)
Колиформни 30° С	течни млечни продукти	m = 0

M = 5

n = 5

c = 2

сметана или масло,

произведени от пастьор-

ризирано мляко или

крем m = 0

M = 10

n = 5

c = 2

меки сирена (произведе-  
ни от топлинно обрабо-  
тено мляко)  $m = 10000$

$M = 100000$

$n = 5$

$c = 2$

продукти, произведени

от мляко на прах  $m = 0$

$M = 10$

$n = 5$

$c = 2$

замразени млечни

продукти (вкл.

сладолед)(а)  $m = 10$

$M = 100$

$n = 5$

$c = 2$

саламурени сирена, парени сирена  $m = 100$

$M = 1000$

$n = 5$

$c = 2$

йогурт  $m = 0$

$M = 5$

$n = 5$

$c = 2$

Психротрофни микроорганизми      течни топлинно обрабо-

тени млечни нефермен-

тирала продукти  $m = 50000$

$M = 100000$

$n = 5$

$c = 2$

замразени млечни про-

дукти (вкл. сладолед) (в)  $m = 100000$

$M = 500000$

$n = 5$

$c = 2$  а) (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) след инкубация при  $6^{\circ}\text{C}$  за пет дни (брой на колониите при  $21^{\circ}\text{C}$ );

б) брой на колониите при  $30^{\circ}\text{C}$ . (Доп., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Тези основни насоки могат да помогнат на производителите за осигуряване на правилна работа на предприятията им и за изпълнение на системата и процедура за извършване на техните собствени проверки при производството им.

4. Млечните продукти в течно или гел състояние, които са преминали УНТ третиране или стерилизация и които са предназначени за консервация при стайна температура, трябва да отговарят на следните стандарти след инкубация за 15 дни при  $30^{\circ}\text{C}$ :

(а) (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) брой на колониите при  $30^{\circ}\text{C}$  (за 0,1 мл)  $<$  или  $= 10$ ;

(в) органолептични тестове нормални. Микробиологични критерии за мляко за пиене 1. Суровото краве мляко за пиене трябва да отговаря на следните микробиологични показатели след опаковането му:

(а) (изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) брой на колониите при  $30^{\circ}\text{C}$  (за 0,1 мл)  $<$  или  $= 50\ 000$ ;

(б) Стафилококус ауреус (в мл)

$m = 100$ ,  $M = 500$ ,  $n = 5$ ,  $c = 2$ ;

Салмонела (не се установява в 25 г)

$n = 5$ ,  $c = 0$  Не се допускат патогенни микроорганизми и техните токсини в количества, увреждащи здравето на консуматора.

2. При внезапно вземане на проби от млекопреработвателните предприятия пастьоризираното мляко трябва да отговаря на следните микробиологични показатели: - патогенни микроорганизми: не се установяват в 25 г  $m = 0$ ,  $M = 0$ ,  $n = 5$ ,  $c = 0$ ; - колиформи (за мл):  $m = 0$ ,  $M = 5$ ,  $n = 5$ ,  $c = 1$  След инкубиране при  $6^{\circ}\text{C}$  за 5 дни Брой на колониите при  $21^{\circ}\text{C}$  (за мл):  $m = 5 \times 10^4$ ,  $M = 5 \times 10^5$ ,  $n = 5$ ,  $c = 1$ .

3. При внезапно вземане на проби от млекопреработвателните предприятия стерилизираното мляко и УНТ мляко трябва да отговарят на следните стандарти след инкубирането им при  $30^{\circ}\text{C}$  за 15 дни: брой на колониите ( $30^{\circ}\text{C}$ )  $<$  или  $= 10$  (за 0,1 мл); фармакологично активни субстанции: непревишаващи стойностите по чл. 50, ал. 3.

## Приложение № 3

### към § 3

(Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

#### Изисквания към качеството на суровото краве мляко

(Загл. изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

(Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Изискването се отнася за сурово краве мляко, предназначено за преработване и млечни продукти. Според органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото мляко може да бъде:

- 1) екстра качество;
- 2) първо качество;
- 3) второ качество.

#### 1. Хигиенни и ветеринарно-санитарни изисквания:

1.1. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Суровото мляко трябва да бъде получено от здрави животни. Изискванията за здравето на животните трябва да бъдат в съответствие с Наредба № 30 от 2001 г. за ветеринарно-санитарните и хигиенните изисквания при добива на сурово мляко, изграждане и експлоатация на млекопреработвателни предприятия, производството и търговията с топлинно обработено мляко и млечни продукти (ДВ, бр. 1 от 2001 г.).

1.2. При получаване на суровото краве мляко са задължителни хигиенните и ветеринарно-санитарните правила за миене и дезинфекция на съоръженията съгласно изискванията на БДС 15141 - 80.

1.3. Не се допуска изкупуването на сурово мляко (коластра) от крави до 7 дни включително от отелването им.

1.4. Суровото краве мляко трябва да бъде чисто, без примеси от други видове мляко, без добавка на почистващи и несвойствени вещества и да не е фалшифицирано.

#### 2. Изисквания към показателите за качество:

2.1. По органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото мляко трябва да отговаря на изискванията, посочени в таблицата:

Показатели	Екстра качество	Първо качество	Второ качество
------------	-----------------	----------------	----------------

1. Външен вид: еднаквост, течност без утайка
2. Цвят: бял със слабо кремав оттенък
3. Вкус: свойствен, приятен, слабо сладникав, без страничен привкус

4. Мирис свойствен, едва доловим, без чужд мирис
5. Консистенция еднородна, нормално плътна, без провлачване
6. Плътност при 20° С, г/см3, не по-малко от 1,029 1,029 от 151,029
7. Масленост в %, не по-малко от 3,6 3,4 3,4
8. Белтък, %, не по-малко от 3,2 3,2 3,2
9. Сух безмаслен остатък, %, не по-малко от 8,5 8,5 8,5
10. Температура на замръзване, не повече от минус 0,520 минус 0,520 минус 0,520
11. Киселинност, Т° от 15 до 18 от 15 до 19 от 15 до 21
12. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)
- Температура на охлаждане, °С, не по-висока от 4 8 10
13. Чистота не се допускат остатъци по филтъра не се допускат остатъци по филтъра  
допускат се единични частици
14. Общ брой микроорганизми, хил./см3, не повече от 300 500 1500
15. Общ брой соматични клетки, хил./см3, не повече от 400 500 1000
16. Патогенни микроорганизми: а) патогенни стафилококи в 0,1 см3 продукт да не се установяват да не се установяват да не се установяват
- б) бактерии от рода Салмонела в 30 см3 продукт да не се установяват да не се установяват да не се установяват
- в) други патогенни бактерии не се допускат не се допускат не се допускат Забележка.

Показателите от таблицата се изследват по посочените в приложението български държавни стандарти. 2.2. Сухият безмаслен остатък (СБО) се изчислява по следната формула:

$$СБО = \frac{М}{Г} + \frac{---}{4} + \frac{---}{5} \cdot 0,76,$$

където:

М е маслеността в проценти;

Г - гъстотата в гстомерни градуси.

2.3. При окачествяването на суровото мляко, предадено от производителите в млекопреработвателното предприятие до 2 часа след издояването, температурата на охлаждане не се взема предвид.

3. Опаковка:

3.1. Суровото краве мляко се извозва до млекосъбирателните пунктове по млекопроводи или в специални съдове от неръждаема стомана, а до млекопреработвателните предприятия - в термоизолирани цистерни.

3.2. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Съдовете и цистерните трябва да бъдат здрави, измити и дезинфекцирани, да имат добре затварящи се капаци, снабдени с гумени уплътнители, и да отговарят на изискванията на съответните нормативни актове.

Изисквания към качеството на сурово мляко овче

(Загл. изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

(Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Изискванията се отнасят за сурово овче мляко, предназначено за преработване на млечни продукти. Според органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото мляко може да бъде:

1) първо качество;

2) второ качество.

1. Хигиенни и ветеринарно-санитарни изисквания:

1.1. Суровото мляко трябва да бъде получено от здрави животни съгласно изискванията на нормативните документи S.I. № 9, 1996 г., на Съвета на Европейската общност.

1.2. При получаване на суровото овче мляко са задължителни хигиенните и ветеринарно-санитарните правила за миене и дезинфекция на съоръженията съгласно изискванията на БДС 15141 - 80 и Наредба № 3 от 1998 г. на МЗГАР.

1.3. Не се допуска изкупуването на сурово мляко (коластра) от овце до 7 дни от оагването им и след 7 месеца в началото на лактацията.

1.4. Суровото овче мляко трябва да бъде чисто, без примеси от други видове мляко, да не съдържа антибиотици, неутрализиращи, почистващи и други несвойствени вещества.

2. Изисквания към показателите за качество:

2.1. По органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото овче мляко трябва да отговаря на изискванията, посочени в таблицата:

Показатели	Първо качество	Второ качество
------------	----------------	----------------

1. Външен вид    еднородна течност без утайка

2. Цвят   бял със слабо пепелив оттенък

3. Вкус   свойствен, приятен, слабо сладникав, без страничен привкус

4. Мирис       свойствен, едва доловим, без чужд мирис

5. Консистенция    еднородна, нормално плътна, без провлачване

6. Плътност при 20° С, г/см<sup>3</sup>, не по-малко от 1,032 1,032
7. Масленост в %, не по-малко от 6,5 6,5
8. Белтък,%, не по-малко от 5,2 5,2
9. Сух безмаслен остатък,%, не по-малко от 10,0 10,0
10. Температура на замръзване, не повече от минус 0,520 минус 0,520
11. Киселинност, Т°
- от 15.V от 21 до 23 от 21 до 26
- от 16.V до 31.VIII от 21 до 25 от 21 до 28
12. Температура на охлаждане, °С, не по-висока от 8 8
13. Чистота не се допускат остатъци по филтъра допускат се единични частици по филтъра
14. Общ брой микроорганизми, хил./см<sup>3</sup>, не повече от 1500 1500
15. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)
16. Патогенни микроорганизми:
- а) патогенни стафилококи в 0,1 см<sup>3</sup> продукт да не се установяват да не се установяват
- б) бактерии от рода Салмонела в 30 см<sup>3</sup> продукт да не се установяват да не се установяват
- в) други патогенни бактерии не се допускат не се допускат 2.2. При окачествяването на суровото овче мляко, предадено от производителите в млекопреработвателното предприятие до 2 часа след издояването, температурата на охлаждане не се взема предвид.

### 3. Опаковка:

3.1. Суровото овче мляко се извозва до млекосъбирателните пунктове по млекопроводи или в специални съдове от неръждаема стомана, а до млекопреработвателните предприятия - в термоизолирани цистерни.

3.2. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Съдовете и цистерните трябва да бъдат здрави, измити и дезинфекцирани, да имат добре затварящи се капаци, снабдени с гумени уплътнители, и да отговарят на изискванията на съответните нормативни актове.

Изисквания към качеството на сурово мляко козе

(Загл. изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

(Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Изискванията се отнасят за сурово козе мляко, предназначено за преработване на млечни продукти. Според органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото мляко може да бъде:

1) първо качество;

2) второ качество.

1. Хигиенни и ветеринарно-санитарни изисквания:

1.1. Суровото козе мляко трябва да бъде получено от здрави животни съгласно изискванията на нормативните документи S.I. № 9, 1996 г., на Съвета на Европейската общност.

1.2. При получаване на суровото козе мляко са задължителни хигиенните и ветеринарно-санитарните правила за миене и дезинфекция на съоръженията съгласно изискванията на БДС 15141-80 и Наредба № 3 от 1998 г. на МЗГАР.

1.3. Не се допуска изкупуването на сурово мляко (коластра) до 7 дни включително от околването им.

1.4. Суровото козе мляко трябва да бъде чисто, без примеси от други видове мляко, да не съдържа антибиотици, неутрализиращи, почистващи и други несвойствени вещества.

2. Изисквания към показателите за качество:

2.1. По органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото козе мляко трябва да отговаря на изискванията, посочени в таблицата:

Показатели	Първо качество	Второ качество
------------	----------------	----------------

1. Външен вид еднородна течност без утайка

2. Цвят бял със слабо пепелив оттенък

3. Вкус свойствен, приятен, слабо сладникав, без страничен привкус

4. Мирис свойствен, едва доловим, без чужд мирис

5. Консистенция еднородна, нормално плътна, без провлачване

6. Плътност при 20° С, г/см<sup>3</sup>, не по-малко от 1,028 1,028

7. Масленост в %, не по-малко от 3,2 3,2

8. Белтък, %, не по-малко от 3,0 3,0

9. Сух безмаслен остатък, %, не по-малко от 8,0 8,0

10. Температура на замръзване, не повече от минус 0,520 минус 0,520

11. Киселинност, Т°, не повече от 19,0 21,0

12. Температура на охлаждане, °С, не по-висока от 8 8

13. Чистота не се допускат остатъци по филтъра допускат се единични частици по филтъра

14. Общ брой микроорганизми, хил./см<sup>3</sup>, не повече от 1500 3000

15. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

16. Патогенни микроорганизми:

- а) патогенни стафилококи в 0,1 см<sup>3</sup> продукт да не се установяват да не се установяват
- б) бактерии от рода Салмонела в 30 см<sup>3</sup> продукт да не се установяват да не се установяват
- в) други патогенни бактерии не се допускат не се допускат 3. Опаковка:

3.1. Суровото козе мляко се извозва до млекосъбирателните пунктове по млекопроводи или в специални съдове от неръждаема стомана, а до млекопреработвателните предприятия - в термоизолирани цистерни.

3.2. Съдовете и цистерните трябва да бъдат здрави, измити и дезинфекцирани, да имат добре затварящи се капаци, снабдени с гумени уплътнители, и да отговарят на изискванията на съответните нормативни актове.

Изисквания към качеството на сурово мляко биволско

(Загл. изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

(Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) Изискванията се отнасят за сурово биволско мляко, предназначено за преработване на млечни продукти. Според органолептичните, физико-химичните, микробиологичните и цитологичните показатели суровото мляко може да бъде:

1) първо качество;

2) второ качество.

1. Производствени изисквания:

1.1. Суровото биволско мляко трябва да бъде получено при непрекъснато доене на напълно здрави и добре хранени неизтощени дойни биволици.

1.2. (Изм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.) При добиване на биволско мляко (миене и дезинфекция на съдовете и инвентара, доенето на животните и грижата за млякото, изискванията за получаване на мляко от болни животни, изискванията за лична хигиена и т.н.) са задължителни санитарните и ветеринарно-санитарните правила.

1.3. Изкупуваното биволско мляко не трябва да съдържа коластра, поради което не се допуска изкупуване на мляко, получено от биволици до 7 дни от отелването им.

1.4. Изкупуваното биволско мляко трябва да бъде чисто, без примеси от други видове мляко, да не съдържа антибиотици, неутрализиращи, почистващи и други несвойствени вещества.

2. Качествени изисквания:

2.1. Биволското мляко трябва да отговаря на изискванията, посочени в таблицата:

Показатели	Първо качество	Второ качество
------------	----------------	----------------

1. Външен вид еднородна течност без утайка

2. Цвят бял със слабо пепелив оттенък

3. Вкус свойствен, приятен, слабо сладникав, без страничен привкус

4. Мирис специфичен за биволското мляко, без чужд мирис

5. Плътност при 20° С, не по-малко от 1,029 1,029

6. Масленост в %, не по-малко от 7,0 7,0

7. Сух безмаслен остатък, %, не по-малко от 9,0 9,0

8. Температура на замръзване, не повече от минус 0,520 минус 0,520

9. Киселинност, Т°, не повече от 19,0 19,0

10. Температура на охлаждане, °С, не по-висока от 8 8

11. Чистота не се допускат остатъци по филтъра

отговаря на еталон 1 за първо качество допускат се единични частици по филтъра

отговаря на еталон 2 за второ качество

12. Патогенни микроорганизми:

а) патогенни стафилококи в 0,1 см<sup>3</sup> продукт да не се установяват да не се установяват

б) бактерии от рода Салмонела в 30 см<sup>3</sup> продукт да не се установяват да не се установяват

в) други патогенни бактерии не се допускат не се допускат 3. Опаковка:

3.1. Изкупуваното биволско мляко се пренася до млекосъбирателните пунктове или млекоцентралите само в специални млечни гюмове (калайдисани, стоманени, алуминиеви) съгласно БДС 3339 - 86 или в алуминиеви цистерни за мляко, разрешени от Министерството на здравеопазването.

3.2. Гюмовете и цистерните трябва да бъдат здрави, измити и дезинфекцирани, да имат добре затварящи се капаци, снабдени с гумени уплътнители, съгласно БДС 7947 - 79, БДС 12420 - 83 и БДС 12429 - 74.

3.3. За предпазване на млякото по време на транспорта през лятото или от замръзване през зимата гюмовете и цистерните се покриват с брезент или платно, които трябва да се поддържат чисти, или да се използват изолирани (термофилни) млекарски съдове.

4. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.).

5. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.).

6. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.).

7. (Отм., ДВ, бр. 111 от 2002 г.).

Приложение № 4

към чл. 20, ал. 4

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Вземане на проби от сурово и топлинно обработено мляко

## I. Общи разпоредби

### 1. Реактиви

#### 1. Вода

1.1. Под вода, която се използва за разтвор, разреждане или промиване, се разбира дестилирана, дейонизирана или деминерализирана вода с равностойна чистота. За целите на микробиологичния анализ тя трябва да бъде стерилна и да не съдържа вещества, които могат да засегнат или повлияят на растежа на микроорганизмите по време на изследване.

1.2. Под "разтвор" или "разреждане", за които няма допълнителни указания, се разбира "разтвор във вода" или "разреждане с вода".

2. Химикали Използваните химикали трябва да бъдат чисти за анализ субстанции (ч.а.с.).

#### 2. Апаратура

1. Списък на апаратурата Апаратурата, която се използва за отделните референтни методи, трябва да се състои само от части, предназначени за специализирана употреба, и части, които са обект на конкретна спецификация.

2. Аналитични везни Под "аналитична везна" се разбира везна със стойност на едно деление от скалата 0,1 mg.

#### 3. Изчисляване на резултатите

1. Резултати Обявените в протокола от анализа резултати се изчисляват като средна аритметична стойност, която е получена от две изследвания, които отговарят на критерия за повторяемост, определен за съответния метод. В случай че критерият за повторяемост не е изпълнен, изследването се повтаря. Ако повторението е невъзможно, резултатът от първия тест се обявява за невалиден.

2. Изчисляване на процентното съдържание Резултатите от изследванията се изчисляват като проценти от масата на пробата.

#### 4. Критерии за точност на определянето: повторяемост и възпроизводимост

1. Критериите за точност на определянето за всеки отделен метод са, както следва:

а) повторяемост ( $r$ ) - стойността, под която се отчита абсолютната разлика между резултатите от две отделни изследвания, получени чрез прилагането на една и съща процедура върху идентичен тест-материал при еднакви условия на провеждане (лице, което провежда изследването, апаратура, лаборатория и през кратък интервал от време);

б) възпроизводимост (R) - стойността, под която се отчита абсолютната разлика между резултатите от две отделни изследвания, получени при прилагането на една и съща процедура върху идентичен тест-материал, но в различни условия (различни лица, провеждащи изпитанието, апаратура, лаборатории и време на провеждане);

в) за всеки отделен метод стойностите за изпълнение на критериите за повторяемост и възпроизводимост за всяка процедура трябва да са в доверителните граници на 95 %.

5. Протокол от изследването В протокола се отбелязват използваният метод на анализ и получените от изследването резултати. Допълнително се записват подробна информация за приложената неспецифична или незадължителна за метода на анализа процедура, както и всички останали обстоятелства, които биха могли да повлияят на получените резултати, и допускът на показателя. Протоколът трябва да съдържа всички данни, необходими за идентификацията на пробата.

## II. Вземане на проби от сурово и топлинно обработено мляко

1. Приложение Процедурата определя референтния метод за вземане на проби от сурово и топлинно обработено мляко. Процедурите за вземане на проби, тяхното транспортиране и съхранение се прилагат за:

а) сурово мляко от производител;

б) сурово и топлинно обработено мляко в танкове за съхранение и транспорт. Процедурите, описани в т. 2, 4.4.1, 5 и 6, се отнасят до вземането на проби от топлинно обработено мляко, предназначено за пряка консумация.

2. Общи правила за вземане на проби Вземането на проби от сурово и топлинно обработено мляко от бидони, танкове и други съдове се извършва от квалифициран персонал, който е преминал необходимото предварително обучение. Органите на НВМС провеждат обучение на персонала, който отговаря за вземането на проби, за запознаване със специални техники и начини за вземане на пробите, които гарантират представителността и съответствието на пробата с цялата партида мляко, както и за начините за маркиране на изследвания материал, които осигуряват точно обозначение и идентифициране на пробите.

### 3. Прибори и апаратура за вземане на проби

3.1. Общи изисквания Приборите и апаратурата за вземане на проби трябва да бъдат изградени от здрав материал от неръждаема стомана, конструирани за съответната цел (разбъркване, вземане на проби и т. н.). Буталата, сондите и бъркалките, използвани за разбъркване на течностите в контейнерите, трябва да имат достатъчна повърхност, която осигурява разбъркване на продукта, и да не влияят върху вкуса на млякото. Лъжиците трябва да имат достатъчно дълга и здрава дръжка, която позволява вземането на млечна проба от дълбочината на контейнера. Вместимостта на лъжицата трябва да бъде не по-малко от 50 ml. Контейнерите, в които се поставят пробите и запушалките, трябва да са от стъкло, подходящ метал или пластмаса. Материалът, от който са направени приборите и апаратурата за вземане на проби (вкл. и контейнерите и запушалките), не трябва да влияе върху резултатите от изследването. Всички повърхности на използваните

приспособления и апаратура за вземане на проби трябва да са гладки, със заоблени ръбове, без пукнатини, чисти и сухи.

3.2. Прибори и апаратура за вземане на проби за микробиологично изследване Освен на изискванията по т. 3.1 приборите и апаратурата, вкл. и контейнерите, в които се поставя пробата, трябва да бъдат стерилни. Ако се използват повторно, те трябва да бъдат измити и стерилизирани в съответствие с изискванията на националната референтна лаборатория, което осигурява достоверността на пробата.

#### 4. Начини за вземане на проби

4.1. Общи изисквания Млякото трябва да се разбърка (от 10 до 15 пъти) чрез ръчни или механични средства преди вземането на пробата независимо от вида на изследванията, които се провеждат. Пробата се взема непосредствено след разбъркване на млякото, преди течността да е достигнала състояние на покой. При едновременното вземане на проби от танкове за различни изследвания най-напред се взема пробата за микробиологично изследване. Обемът на пробата трябва да отговаря на изискванията за изследване. Контейнерите, в които се поставят пробите, трябва да имат вместимост, която позволява да бъдат почти изцяло напълнени с пробата, да осигурява смесване на съдържанието преди изследването и да препятства отделянето на мазнини при транспортиране.

#### 4.2. Ръчно вземане на проби

4.2.1. Вземане на проби от гюмове и бидони Млякото се размесва чрез бързо движение нагоре и надолу на буталото в бидона или гюма, което осигурява добро разбъркване на млякото и не позволява по гърлото на съда да се отложи сметана. Представителна проба за цялата партида се взема в съответствие с т. 4.2.4.

4.2.2. Вземане на проби от охладени танкове или вани от стопанствата Млякото се размесва механично или ръчно, докато се хомогенизира. Ако количеството мляко не е достатъчно за работата на механичната бъркалка, манипулацията се извършва ръчно.

4.2.3. Вземане на проби от мерителен съд При изсипване на млякото в мерителен съд то трябва да се разбърка. При необходимост може да се разбърка допълнително ръчно или механично, за да се осигури равномерното разпределение на мазнината в него. Когато обемът на партидата, от която се взема пробата, е по-голям от вместимостта на мерителния съд, се прави представителна за цялата партида проба съгласно изискванията по т. 4.2.4.

4.2.4. Вземане на проби от партида мляко в различни контейнери Когато млякото, от което се взема проба, е поставено в повече от един контейнер, от всеки контейнер се взема представително количество, като се отчита неговото количество. Частите от представителните количества се смесват пропорционално на количеството мляко, съдържащо се в контейнера, от който е взета пробата, освен ако млечните проби от всеки контейнер не се изследват поотделно. Проби от съответните пропорционални количества мляко в контейнерите се вземат след разбъркване.

4.2.5. Вземане на проби от големи съдове - танкове, предназначени за съхранение, железопътен и автомобилен транспорт на млякото

4.2.5.1. Преди вземане на пробите млякото се разбърква чрез съответната процедура. За смесване на съдържанието в големи съдове за съхранение на млякото при железопътен или автомобилен транспорт се препоръчва механично разбъркване (вж. т. 4.2.5.2). Степента на разбъркване трябва да съответства на времето, в което млякото е било в покой. Ефективността на разбъркването за всеки отделен случай се определя в зависимост от целите на предвидения анализ. Критерият за ефективност на разбъркването на млякото влияе на еднаквостта на резултатите от изследването на проби, взети от различни части на партидата или от отвора на танка през различни интервали на изпразване на съда. Разбъркването на млякото е резултатно и ефективно, ако разликата в масленото съдържание на две проби, взети при тези условия, е по-малка от 0,1 %. В големи съдове с долно изпускане е възможно събирането на малко количество мляко при отвора, което не е представително за цялото съдържание на съда дори и след разбъркване. Затова се препоръчва вземането на пробите да се извършва чрез ревизионен отвор (люк). За да се осигури представителността на проба, взета от отвора за източване, се изпуска достатъчно количество мляко.

4.2.5.2. Разбъркването в големи съдове за съхранение на млякото при железопътен или автомобилен превоз се осъществява чрез:

- а) механична бъркалка, вградена в танка и задвижвана от електромотор;
- б) перка или бъркалка, потопена в млякото, задвижвана от електромотор и монтирана на ревизионния отвор;
- в) за цистерни за железопътен и автомобилен превоз на млякото - чрез рецикулация на млякото през ръкава (маркуча) за прехвърляне на течността, прикрепен към източващото помпено устройство на цистерната, въведен през ревизионния отвор;
- г) чрез чист филтриран въздух под налягане, като се използват минимално въздушно налягане и обем, за да се избегне създаването на неприятен, гранясал мирис.

#### 4.3. Автоматично или полуавтоматично вземане на проби

Автоматичните и полуавтоматичните уреди за вземане на проби от сурово мляко от производител се използват при спазване на указанията на лабораторията, която провежда изследването. Преди и периодично по време на използването им уредите се подлагат на калибриране в съответствие с изискванията на производителя. Приложимостта на процедурите за вземане на проби се проверява с цел да се определят:

- а) минималният обем събрано мляко, от което могат да се вземат проби;
- б) задържаното количество, което е свързано с минималния обем на пробата;
- в) възможността за получаване на представителна проба след правилното разбъркване на цялото количество. При използването на автоматични или полуавтоматични уреди органите на НВМС определят:
  - а) минималния обем мляко, от което се взема пробата;
  - б) минималния обем на пробата;

в) максималното задържано количество;

г) вида на анализа, който следва да се извърши, и предпазните мерки.

4.4. Вземане на проби от топлинно обработено мляко, предназначено за пряка консумация от човека, в разфасовки за директна консумация

Пробите от топлинно обработено мляко в разфасовки за директна консумация не се вземат в отделни съдове, а се представят в херметичен материал за пакетиране. При възможност пробите трябва да се вземат директно от машината за пакетиране или помещението за охлаждане или замразяване на предприятието непосредствено след преработката, а за пастьоризираното мляко - в деня на преработката. Пробите от всеки отделен вид топлинно обработено мляко (пастьоризирано, произведено по УНТ технология или стерилизирано) се вземат в брой, който съответства на броя на предстоящите изследвания съгласно указанията на органите на НВМС. Пробата се придружава с документ (акт за вземане на проби), който съдържа: - дата и място на пробовземането; - име и адрес на производителя; - имена на пробовземателя и свидетели; - точен метод на пробовземане, ако се разминава от инструкцията и количеството проба пропорционално на партидата (л); - произход на партидата, маркировъчен код, номер на пробата, съответстващ на този на партидата; - място, където се изпращат пробите и за какво изпитване; - по-специална информация, свързана с продукта (при трудност за осъществяване хомогенност на продукта се посочва използваният консервант); - вземане на резервна проба за температурен контрол по време на транспортиране до изпитвателната лаборатория при необходимост. В случай на съгласуване между две страни се вземат допълнителни дубъл проби, които се пазят за арбитражни цели.

5. Идентификация на пробата Пробата се маркира с идентификационен код, който позволява лесното и бързото ѝ идентифициране (вж. т. 2).

6. Транспортиране и съхранение на пробите Органите на НВМС изготвят инструкции относно условията за транспортиране, съхранение и времето между вземането на пробата и анализа на млякото в зависимост от вида мляко и метода на последващия анализ. Те включват:

1. предпазните мерки, които трябва да се вземат по време на транспорта и съхранението с цел пробите да не се излагат на пряка слънчева светлина и влиянието на вредни миризми; ако контейнерът, в който е поставена пробата, е прозрачен, той трябва да се съхранява на тъмно;

2. пробите от сурово мляко за микробиологичен анализ се транспортират и съхраняват при температура между 0 и 4°C; времето между вземането на пробата и изследването ѝ до 1.1.2007 г. трябва да е до 12 часа; след тази дата времето между вземането на пробата и изследването ѝ трябва да е до 36 часа; органите на НВМС могат да допуснат млякото да бъде съхранявано и при температура от 0 до 6°C, ако времето между вземането на пробата и анализа е до 24 часа;

3. пробите от пастьоризирано мляко за микробиологичен анализ се транспортират и съхраняват при температура от 0 до 4°C; времето между вземането на пробата и изследването ѝ трябва да е до 24 часа;

4. пробите за микробиологичен анализ на мляко, различно от суровото и пастьоризираното, се съхраняват при хладилни условия, а времето между вземането им и анализа трябва да бъде възможно най-кратко.

Приложение № 5

към чл. 20, ал. 4

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

#### Определяне точката на замръзване

1. Приложение Процедурата определя референтния метод за определяне точката на замръзване на сурово, пастьоризирано, произведено по УНТ технология и стерилизирано пълномаслено, частично и напълно обезмаслено мляко чрез криоскоп (термистор), в който термостатично регулираната баня се охлажда чрез електрическо изстудяване, а живачният термометър е заменен от термисторна сонда. Използват се два вида уреди. Единият проследява достигането на максималната точка на замръзване върху "платото" на кривата на замръзване, а другият по търговски съображения е конструиран да отчита стойностите през точно определени интервали от време след началото на замръзването. В зависимост от различните криви на замръзване както на различните видове мляко, така и на млякото и стандартните разтвори референтният метод налага използването на уреди от първия тип, т. е. проследяващи достигането на плато от кривата. Уредите с определен интервал на отчитане могат да се използват като рутинни контролни измервания. Точката на замръзване може да се използва за определяне количеството примеси на вода в млякото, ако киселинността на пробата не надвишава 0,18 g млечна киселина в 100 ml (20 °T) (вж. т. 7.4).

2. Определение Точка на замръзване на млякото е стойността, получена чрез измервания, проведени съгласно описания метод, и изразена в градуси по Целзий (°C).

3. Принцип Определена тест-порция от млякото се преохлажда до съответната температура в зависимост от уреда и чрез механична вибрация, която води до покачване на температурата до определено плато, съответстващо на точката на замръзване на пробата, се предизвиква кристализация. Уредът се калибрира чрез нагласяване за получаване на точни резултати за два стандартни разтвора чрез същата процедура, която се използва за пробата мляко. При тези условия платото съответства на точката на замръзване на млякото в градуси по Целзий.

#### 4. Апаратура и лабораторна стъклария

##### 4.1. Криоскоп

Криоскоп. Положение на епруветката с пробата мляко спрямо стъкления край на термисторната сонда и бъркалката Криоскопът се състои от термостатично регулирана охлаждаща баня,

термисторна сонда (полупроводников резисторен термометър) със свързана с нея електрическа верига и галванометър или отчитащо устройство, бъркалка за проби, уред за инициране на замръзване, епруветки за проби.

4.1.1. Охлаждаща баня Използват се два вида охлаждащи бани:

4.1.1.1. Имерсионен вид Добре изолирана баня с охлаждаща течност, която се разбърква така, че температурната разлика между всеки две точки от обема на течността да не е по-голяма от 0,2 °C. Температурата на течността не трябва да варира с повече от 0,5 °C от обявената от производителя стойност. Течността в охлаждащата баня се поддържа на постоянно ниво и трябва да покрива цялата повърхност на епруветката с пробата, която се намира под обемната мярка на стъклото.

4.1.1.2. Циркулационен вид Осигурява се постоянен приток на подходящ охлаждащ агент (течност), циркулиращ около епруветката. Температурата на течността не трябва да варира повече от ± 0,5 °C от обявената от производителя стойност. За охлаждащ агент се използва 33 % (v/v) воден разтвор на етан 1,2 диол (етилен гликол).

4.1.2. Термистор и придружаваща го електрическа верига Термисторът е от типа на стъклената сонда с диаметър не по-голям от 1,80 ± 0,2 mm и диаметър до 0,31 mm. Времевата константа трябва да е по-малка от 2 секунди, а стойността на  $\tau$  висока (вж. забележката). Постоянното работно напрежение, стойността на тока и топлинното разсейване трябва да бъдат такива, че температурата на термистора да не се повишава с повече от 0,0005 °C от тази на заобикалящата го среда ( - 0,512 °C). Максимално допустимото отклонение в напрежението трябва да бъде 5,0 %. Когато сондата е в работно положение в криоскопа, стъкленият ѝ връх трябва да лежи по вертикалната ос на епруветката на разстояние 44,6 ± 0,1 mm под отвора на съда (вж. фиг. 1). За поставянето на сондата в това положение се използва държател.

Забележка.  $\beta$  определя характеристиките на температурно съпротивление на термистора по формулата:

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

където:

T е температурата по Келвин;

R - съпротивлението в омега при температура T;

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

- температурният коефициент;

$\beta$  - константа, чиято стойност зависи от материала, от който е направен термисторът; в сега съществуващата практика се препоръчва стойност, по-голяма от 3000.

#### 4.1.3. Измерване и отчитащо устройство

4.1.3.1. Принцип на измерване Използваният уред работи на принципа на отчитане достигането на първото "плато" от кривата на точката на замръзване. Платото е този сектор от кривата, в който температурата остава постоянна в интервал  $\pm 0,002$  °C в продължение на поне 20 секунди.

4.1.3.2. Ръчна операция Съпротивлението на термистора се стабилизира чрез Мост на Уийтстон или друго подобно устройство. Използват се устойчиви резистори с високо качество с отклонение до  $\rho 10\%$  и температурен коефициент до  $2 \times 10^{-5}$  °C. Променливият (стабилизиращият) резистор не може да се отклонява от линейността на тока по целия обхват на веригата с повече от  $0,3\%$  от максималната му стойност. Необходимо е да се предвиди средство за коригиране и нагласяване на резисторите за калибрирането им. Измервателната скала се градуира на интервали не по-големи от  $0,001$  °C.

4.1.3.3. Автоматична операция Отчитащото устройство трябва да има точност, която да позволява отчитането на разлики в температурния интервал от 0 до  $-1$  °C най-малко  $0,001$  °C. Разделителната способност на отчитащото устройство и свързаната с него електрическа верига трябва да бъде такава, че разликата между последователните индикации на една и съща температура да не е по-голяма от  $0,001$  °C. Линейността на тока по веригата трябва да бъде такава, че в нито една точка от интервала минус  $0,400$  °C - минус  $0,600$  °C допустимата грешка да не е по-голяма от  $\pm 0,001$ .

4.1.4. Бъркалка За разбъркването на тест-порцията се използва бъркалка от индиферентен към съставките на млякото метал с диаметър между 1 и 1,5 mm. Бъркалката се наглася за амплитудата на вибрации и се потапя вертикално, като долният ѝ край се изравнява със стъкления връх на термисторната сонда. Допуска се отклонение 1,5 mm от това ниво. Бъркалката вибрира странично с амплитуда повече от  $\pm 1,5$  mm съгласно указанията на производителя, за да се осигури еднаква и равномерна температура на тест-порцията по време на определянето. Не се допуска контакт на бъркалката със сондата или стената на епруветката по време на нормалното разбъркване на пробата.

4.1.5. Устройство за предизвикване на замръзването Това е устройство, което, приведено в работен режим, предизвиква незабавно замръзване на пробата, така че температурата на тест-порцията да намалява към точката на замръзване. За тази цел може да се използва бъркалката, като се увеличи амплитудата на вибрации за около една до две секунди, така че бъркалката да влезе в контакт със стената на епруветката с пробата.

4.1.6. Епруветки за пробата Епруветките за пробата (вж. фиг. 1) трябва да са стъклени с дължина  $50,8 \pm 0,1$  mm, външен диаметър  $16,0 \pm 0,1$  mm и вътрешен диаметър  $13,5 \pm 0,1$  mm. Допустимата разлика в дебелината на стените е не повече от 0,1 mm. Епруветките трябва да са означени с обемна мярка 29,8 mm под края (21 mm над основата на съда) за обозначаване обем на пробата  $2,5 \pm 0,1$  ml.

4.1.7. Електрическо захранване Напрежението на захранващия източник се стабилизира в уреда или чрез външен стабилизатор така, че флуктуациите да не превишават 1 % от номиналната стойност при променливост на тока в мрежата  $\pm 6$  %.

4.2. Аналитични везни

4.3. Мерителна колба с единична обемна мярка и вместимост 1000 ml, клас А

4.4. Сушилня с добра вентилация, която поддържа температура от  $130 \pm 1$  °C, или електрическа пещ с вентилация, която поддържа температура от  $300 \pm 25$  °C

4.5. Ексикатор

5. Реактиви

5.1. Дестилирана в боросиликатно стъкло вода, нагрята до кипене и охладена до температура  $20 \pm 2$  °C, поставена в колба, снабдена с епруветка за абсорбиране на въглеродния двуокис

5.2. Натриев хлорид, ч.з.а., фино смлян и изсушен в пещ при температура  $300 \pm 25$ °C в продължение на 5 часа или в сушилня при температура  $130 \pm 1$ °C за не по-малко от 24 часа и охладен в ексикатор до стайна температура

5.3. Приготвяне на стандартни разтвори Съответното количество сух натриев хлорид (т. 5.2) (вж. таблицата) се претегля в тегловно стъкло. Разтваря се в дестилирана вода (т. 5.1) и се прехвърля количествено в мерителна колба с единична обемна мярка от 1000 ml, след което се разрежда с водата до обемната мярка при температура  $20 \pm 2$  °C. Разтворът се съхранява при температура 5°C в добре затворени полиетиленови шишета с вместимост до 250 ml най-много два месеца. Точка на замръзване на разтворите на натриев хлорид, приготвени при температура 20 °C

g NaCl/l°C

6,859 -0,408

7,818 -0,464

8,149 -0,483

8,314 -0,492

8,480 -0,502

8,646 -0,512

8,811 -0,521

8,977 -0,531

9,143 -0,541

10,155 -0,600

Преди употреба полиетиленовото шише със стандартния разтвор се обръща и разклаща неколккратно и внимателно с кръгообразни движения до хомогенното смесване на съдържанието. Разтворът не трябва да се разбърква енергично, за да се избегне образуването на въздушни мехурчета. Пробите със стандартния разтвор се прехвърлят от шишето чрез разливане в чиста и суха бехерова чаша. Не се допуска прехвърлянето на разтвора чрез пипети. Не се допуска използването на разтвори, съхранявани в шишета, които са напълнени до една четвърт от обема им, както и употребата на разтвори, които са престояли повече от два месеца, ако не са били третирани с фунгициден препарат (например разтвор на тиомерзал, 10 g/l).

6. Калибриране на криоскопа Криоскопът трябва да бъде конструиран по начин, който не позволява отклонение на температурата на околната среда от температурата на калибриране повече от 1 °C. Уредът не трябва да се излага на слънчева светлина, течение или стайна температура, по-висока от 27 °C. Преди началото на анализа се проверява съответствието на работното състояние на криоскопа с указанията на производителя. Уредът се включва към хранящото устройство най-малко 12 часа преди започването на калибрирането в зависимост от изискванията на техническата спецификация. Проверяват се положението на сондата, амплитудата на трептенията и температурата на охлаждащия агент. Избират се двата стандартни разтвора (вж. таблицата) с най-точно приближение до очакваната точка на замръзване на пробите мляко за изследване. Разликата между точките на замръзване на разтворите трябва да е не по-малка от - 0,100 °C. (В някои от сега предлаганите модели на криоскопа е заложено свързаната с термистора верига да се уравнива при определена специфична стойност на точката на замръзване в обхвата на измерване на уреда. В този случай използването на стандартен разтвор с точка на замръзване като тази на калибращите разтвори улеснява самото калибриране, като производителят задължително обявява посочената стойност.) 2,5 ± 0,1 ml от даден стандартен разтвор се отпипетира в чиста и суха епруветка с пробата за изследване, след което се поставя в работещия криоскоп. Забележка. Епруветките с пробите за калибриране трябва да бъдат от същото стъкло както това на епруветките за изследване на пробите мляко и да бъдат изплакнати и промити с деминерализирана вода едновременно с тях. Температурата на стандартните разтвори трябва да е сходна с тази на пробите с мляко. Калибрационните контроли се нагласяват според указанията на производителя, докато отчетените от криоскопа резултати се изравнят с точката на замръзване на стандартния разтвор, като се редуват стандартните разтвори. Процедурата се повтаря докато две последователни отчитания за всеки стандартен разтвор покажат точната стойност на точката му на замръзване без допълнителна корекция на контролите. Криоскопът се привежда в работен режим и се подготвя да отчита директно точката на замръзване на пробата с мляко без допълнителни корекции.

## 7. Подготовка на пробите за изследване

7.1. Пробите се съхраняват при температура от 0 до 5 °C, когато са в голямо количество и не могат да бъдат изследвани същия ден.

7.2. От пробата се отстраняват всички видими чужди тела или твърди маслени частици, ако се налага чрез филтриране, в чист и сух съд. Съдържанието се разбърква добре. Използваният филтър трябва да бъде от индиферентен към млякото материал, който работи при лабораторна температура.

7.3. Млякото може да се изследва при температурата, при която се съхранява (между 0 и 5 °C) или след уеднаквяване с лабораторната температура преди започване на анализа. Температурата на стандартните разтвори и тази на пробите мляко обаче трябва да бъдат еднакви.

7.4. Едновременно с определяне точката на замръзване се определя и титруемата киселинност на млякото. Когато титруемата киселинност превишава 0,18 g млечна киселина на 100 ml (20 °T) за краве мляко или до 26 °T за овче мляко, млякото не може да се изследва.

7.5. Преди започване на анализа произведеното по УНТ технология мляко и стерилизираното мляко трябва да престоят в отворен контейнер поне 20 минути.

## 8. Процедура

8.1. Предварителни проверки Проверява се нивото и температурата на охлаждащия агент дали съответстват на указанията на производителя и ако е необходимо - дали сондата на термистора е в празна епруветка във ваната за проби. Криоскопът се привежда в работен режим, проверява се дали охлаждащата течност се разбърква или циркулира правилно. След като уредът е работил най-малко 12 часа, се проверява температурата на охлаждащата течност, положението и амплитудата на вибрации на бъркалката.

8.2. Рутинна проверка на калибрирането Преди всяко изследване се измерва точката на замръзване на стандартния разтвор на натриев хлорид (например разтвор с точка на замръзване минус 0,512 °C), докато разликата между две последователни определяния стане по-малка от 0,001 °C. Ако тази стойност се различава с повече от 0,002 °C от точката на замръзване на стандартния разтвор, криоскопът се калибрира отново, както е описано в т. б. Ако уредът се използва продължително време, трябва да се извърши рутинна проверка на калибрирането най-малко един път на час, като се спазват указанията на производителя.

8.3. Определяне точката на замръзване на млякото Стъклото с пробата мляко се обръща и разклаща внимателно с кръгообразни движения до хомогенното смесване на съдържанието. Млякото не трябва да се разбърква енергично, за да се избегне образуването на мехурчета. 2,5 ± 0,1 ml мляко се прехвърлят в чиста и суха епруветка с пипета. Излишното количество се отстранява чрез пипета. Сондата и бъркалката трябва да бъдат чисти и сухи. Когато е необходимо, се забърсват от долу на горе с мека и чиста кърпа без влакна. Епруветката с пробата мляко се поставя в калибрирания криоскоп съгласно указанията на производителя. Млякото се охлажда, замръзването започва при температура, определена от производителя с разлика от 0,1 °C. (На някои автоматични уреди тази температура се отчита на дигиталното четящо устройство. Точността на ръчните уреди се определя след проверка, че замръзването започва, когато стрелката или визирната линия на галванометъра съвпадне със съответното обозначение.) Ако по някаква причина замръзването започне след или преди достигането на определените температурни граници, епруветката се отстранява и изследването се повтаря с нова тест-порция. Ако и при повторната проба млякото замръзне преди определената температура, допълнителна тест-порция се загрява до 45 °C в продължение на 5 минути до разтопяване на кристализиралата мазнина. Пробата се охлажда отново до температурата на изследване и се изследва. След предизвикване на замръзването температурата на млякото се повишава бързо до временно константна величина, след което отново намалява. Точката на замръзване съответства на най-високата температура, постигната през това време. Регистрира се най-високата стойност.

Забележка. Времето, през което температурата остава постоянна, и времето между предизвикването на замръзването и достигането на най-високата температура е различно за различните проби и значително по-кратко за водата и стандартните разтвори на натриев хлорид в сравнение с млякото. Затова е необходимо да се запише най-високата температура. След измерването епруветката се изважда, изплаква с вода, а термисторната сонда и бъркалката се подсушават отдолу нагоре с мека и чиста кърпа без власинки. След това се извършва паралелно определяне върху друга част от пробата с мляко. Ако разликата между получените точки на замръзване е по-голяма от стойността на повтораемост (0,004 °C), се прави паралелно определяне върху друга част от пробата. Ако съответствието между двете определяния е с точност до 0,004 °C, съответните стойности се записват и използват за изчисление на крайния резултат.

8.4. Охлаждане на сондата След използване на уреда във ваната се поставя празна епруветка и главата на термистора се сваля, за да се поддържа сондата охладена. (В някои модели на криоскопа тази операция е невъзможна. Затова е много важно сондата да е охладена правилно преди започване на измерванията - например чрез празни определяния до регистрирането на стабилни отчитания.)

## 9. Представяне на резултатите

9.1. Изчисление Ако след рутинната проверка калибрирането бъде потвърдено, се изчислява средната стойност на получените допустими точки на замръзване и се закръглява до третия десетичен знак. Ако сумата от две допустими паралелни определяния е нечетно число, средната стойност се закръглява до най-близкото четно число, както е показано в примера:

Точка на замръзване

(°C)      Паралелни стойности      Средна стойност

- 0,544   - 0,545   - 0,544

- 0,545   - 0,546   - 0,546

### 9.2. Точност

9.2.1. Повтораемост (r): 0,004 °C.

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

Приложение № 6

към чл. 20, ал. 4

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Изброяване на общ брой микроорганизми при температура 30 °C

1. Приложение Процедурата определя референтния метод за изброяване на микроорганизмите чрез метода за преброяване на колониите при температура 30 °С. Прилага се за суровото и пастьоризирано мляко, както и за произведеното по УНТ технология и стерилизирано мляко, предварително инкубирано при температура 30 °С в продължение на 15 дни.

2. Определение Под "микроорганизми" се разбира микроорганизми, способни да образуват броими колонии при аеробно култивиране при описаните условия.

3. Принцип Определен обем от пробата с мляко за изследване се смесва с хранителна среда в петриеви панички и се инкубира при температура 30 °С в продължение на 72 часа. Определя се броят на порасналите колонии и се изчислява общият брой на микроорганизмите в 1 ml сурово или пастьоризирано мляко или в 0,1 ml предварително инкубирано, произведено по УНТ технология или стерилизирано мляко.

4. Апаратура и лабораторна стъклария Стандартно лабораторно оборудване:

4.1. Апаратура

4.1.1. Стерилизатор на горещ въздух при температура от 170 до 175 °С.

4.1.2. Автоклав, работещ при температура  $121 \pm 1$  °С.

4.1.3. Инкубатор (термостат), поддържащ температура от  $30 \pm 1$  °С в цялото работно пространство.

4.1.4. рН-метър с компенсация на температурата и точност  $\pm 0,1$  рН.

4.1.5. Водна баня с регулатор на температурата при  $45 \pm 1$  °С.

4.1.6. Лупа с увеличение 2-4х.

4.1.7. Лупа с увеличение 8-10х.

4.1.8. Броителна камера/регистриращ броящ.

4.1.9. Миксер за разбъркване на 1 ml от пробата или десетократно разреждане с 9 ml разреждател, работещ на принципа на ексцентричната ротация.

4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Епруветки с подходящи запушалки и пространство за разбъркване и достатъчна вместимост за 10 ml основно разреждане или други десетократни разреждания.

4.2.2. Колби с вместимост от 150 до 250 ml или епруветки с приблизителна вместимост 20 ml за посяване на хранителната среда.

4.2.3. Пипети (с памучни запушалки) от стъкло или стерилен синтетичен материал със здрав край, с номинална вместимост 1 ml и отвор с диаметър 1,75 до 3 mm.

4.2.4. Петриеви панички от безцветно прозрачно стъкло или стерилен синтетичен материал, с вътрешен диаметър на долната паничка от около 90 - 100 mm и дълбочина най-малко 10 mm. Дъното трябва да бъде гладко, за да не пречи на точното преброяване на колониите.

4.2.5. Стерилизация на лабораторната стъклария. Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в сушилня на горещ въздух при температура от 170 до 175 °C за не по-малко от един час (т. 4.1.1);

б) в автоклав (т. 4.2.1) при температура  $121 \pm 1$  °C за не по-малко от 20 мин. При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъклариата. Така например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, те не трябва да бъдат плътно затворени, а колбите трябва да са с отворени капаци. Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата. Пипетите се стерилизират в сушилня на горещ въздух (т. 4.1.1).

## 5. Хранителна среда - агар за изброяване на микроорганизмите

5.1. Състав на средата: дрождев екстракт - 2,5 g; триптон - 5,0 g; глюкоза D (+) или декстроза - 1,0 g; обезмаслено мляко на прах - 1,0 g; агар-агар - 10 до 15 g в зависимост от желиращите свойства на използвания агар; вода - 1000 ml. Обезмасленото мляко на прах трябва да бъде свободно от инхибитори, което се определя чрез сравнителни изследвания, ползващи обезмаслено мляко на прах, за което се знае, че е свободно от инхибитори. Приготвяне на хранителната среда Съставките се суспендират и разтварят във водата в следната последователност: дрождев екстракт, триптон, глюкоза, обезмасленото мляко на прах. Нагряването на суспензията улеснява манипулацията. Прибавя се агар-агарът и се нагрява до кипене, като непрекъснато се разбърква до пълното му разтваряне или се разтваря на пара в продължение на 30 мин. При необходимост се филтрира през филтърна хартия. С рН-метър (т. 4.1.4) се проверява активната киселинност на средата и при необходимост се коригира, така че след стерилизацията да е равна на  $6,9 \pm 0,1$ , като се използва разтвор (не по-малко от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина.

5.2. Разпределение, стерилизация и съхранение на хранителната среда Средата (т. 5.1) се разлива в количества от 100 - 150 ml в колби или 12 - 15 ml в епруветки (т. 4.2.2), след което съдовете се затварят със запушалки и се стерилизират в автоклав (т. 4.1.2) при температура  $121 \pm 1$  °C за 15 мин. Проверява се рН на средата. Ако не се използва веднага, хранителната среда се съхранява на тъмно при температура между 1 и 5 °C най-много един месец, след като е била приготвена.

5.3. Готова суха хранителна среда Хранителната среда (т. 5.1) може да бъде приготвена и от готова суха среда, предлагана на пазара, като се спазват указанията на производителя. Ако средата не съдържа в състава си обезмаслено мляко на прах, то се прибавя непосредствено преди разтварянето. Коригира се рН на  $6,9 \pm 0,1$  при температура 25 °C, както е описано в т. 5.1, след което средата се поставя в съответните съдове, стерилизира се и се съхранява по указанията в т. 5.2 начини.

## 6. Разредители

6.1. Пептон-солов разтвор Състав: пептон - 1,0 g; натриев хлорид (NaCl) - 8,5 g; вода - 1000 ml. Приготвяне Съставките се разтварят във вода. При необходимост така полученият разтвор се нагрява. С рН-метър (т. 4.1.4) се проверява активната киселинност на разредителя и при необходимост се коригира, така че след стерилизацията да е равна на  $7,0 \pm 1$  °C при температура 25 °C, като се използва разтвор (не по-малко от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина.

6.2. Разпределение, стерилизация и съхранение на разредителя Разредителят (т. 6.1) се пресипва в епруветки (т. 4.2.1) в такива количества, че след стерилизацията обемът на разредителя да е равен на  $9,0 \pm 0,2$  ml, след което епруветките се затварят със запушалки и се стерилизират в автоклав (т. 4.1.2) при температура  $121 \pm 1$  °C в продължение на 15 мин. Проверява се рН на разредителя. Ако не се използва веднага, разредителят се съхранява на тъмно при температура между 1 и 5 °C най-много един месец, след като е бил приготвен.

6.3. Готов сух разредител Разредителят (т. 6.1) може да бъде приготвен и от готови таблетки или прах, предлагани на пазара, като се спазват указанията на производителя. Кorigира се рН на разредителя, както е описано в т. 6.1, и се поставя в съответните съдове, стерилизира се и се съхранява по указанията в т. 6.2 начини.

## 7. Процедура

7.1. Разтапяне на хранителната среда Необходимото количество среда се разтапя бързо и темперира на водна баня (т. 4.1.5) до  $45 \pm 1$  °C преди началото на микробиологичното изследване.

7.2. Подготовка на пробата мляко Пробата мляко се размесва добре, за да се осигури най-равномерно разпределение на микроорганизмите чрез бързо 25-кратно обръщане на контейнера с пробата, като се избягва образуването на пяна или ако има такава, тя се оставя да се диспергира. Времето между смесването на пробата и отпипетирането на тест-порцията не трябва да превишава три минути.

7.3. Приготвяне на основно разреждане (10-1) сурово и пастьоризирано мляко 1 ml от пробата със сурово или пастьоризирано мляко (т. 7.2) се прехвърля със стерилна пипета (т. 4.2.3) в 9 ml разредител (т. 6.1), като се внимава пипетата и разредителят да не влизат в контакт. Температурата на разредителя трябва да бъде приблизително равна на температурата на пробата с мляко. За окончателното му получаване основното разреждане внимателно се смесва с миксер (т. 4.1.9) за около 5 - 10 секунди.

7.4. Приготвяне на следващи десетократни разреждания (сурово и пастьоризирано мляко) За получаване на десетократни разреждания 1 ml от основното разреждане (т. 7.3) се прехвърля чрез стерилна пипета (т. 4.2.3) в 9 ml от разредителя (т. 6.1), като се спазват указанията, дадени в т. 7.3. Получава се разреждане 10-2. Приготвянето на допълнителни десетократни разреждания се извършва чрез повторение на същите манипулации до получаване на съответния очакван брой микроорганизми (т. 8.1.1).

## 7.5. Инокулиране на петриевите панички

7.5.1. Сурово мляко: 1 ml от пробата и/или съответното десетократно разреждане се прехвърлят в петриева паничка (т. 4.2.4) със стерилна пипета (т. 4.2.3). Изследват се най-малко две разреждания. Приготвя се по едно петри от всяко десетократно разреждане (т. 8.1.1).

7.5.2. Пастьоризирано мляко: 1 ml от пробата и/или съответното десетократно разреждане се прехвърлят в петриева паничка (т. 4.2.4) със стерилна пипета (т. 4.2.3). Изследват се най-малко две разреждания. Приготвя се по едно петри от всяко десетократно разреждане (т. 8.1.1).

7.5.3. Произведено по УНТ технология и стерилизирано мляко (изследва се след култивиране в продължение на 15 дни при температура 30 °C): 0,1 ml от пробата с мляко (т. 7.2) се прехвърля в петриева паничка (т. 4.2.4) със стерилна пипета (т. 4.2.3). Приготвят се две петри.

7.6. Разливане в петриevi панички Върху посевките във всяка петриева паничка се разливат от 15 до 18 ml от средата (т. 7.1). Непосредствено след разливането ѝ хранителната среда се размесва с инокулума в петрито чрез кръгообразни движения, за да се получи равномерно разсейване на колонииите след инкубация. Времето между окончателното приготвяне на пробата мляко и смесването със средата - в зависимост от вида мляко, тест-порцията или разреждането, не трябва да превишава 15 минути. Петритата се поставят на чиста, хладна хоризонтална повърхност до втвърдяване на съдържанието. 7.7. Инкубиране на петриевите панички Петритата се поставят в инкубатор (т. 4.1.3). Култивират се обърнати не повече от шест една върху друга, разделени помежду си и от стените и тавана на инкубатора при температура  $30 \pm 1$  °C в продължение на  $72 \pm 2$  часа. 7.8. Изброяване на колонииите Изброяват се колонииите в петрита, които съдържат по-малко от 300 колонии. Петритата се изследват на непряка светлина. За улесняване на изброяването може да се ползва лупа (т. 4.1.6) и/или броителна камера (т. 4.1.8). Специално внимание трябва да се обърне на частиците от утаечни вещества в петрита, които не трябва да се бъркат с колонииите с формата на глава на топлийка (точковидни колонии). За различаване на колонииите от чуждите тела съмнителните обекти се изследват внимателно, при необходимост с помощта на лупа с по-голямо увеличение (т. 4.1.7). Разлети или слети колонии се броят като една. Ако разливането е обхванало по-малко от една четвърт от петриевата паничка, се изброява броят на колонииите в незасегнатата повърхност на петрито, след което се изчислява съответното число за цялото петри. Ако е покрита по-голяма част от една четвърт на петрито, то се отстранява.

## 8. Изчисляване на резултатите

### 8.1. Прясно и пастьоризирано мляко

8.1.1. Използват се резултатите от всички петриevi панички, съдържащи между 10 и 300 колонии (вж. т. 8.1.3 и 8.1.4).

8.1.2. Броят на микроорганизмите (бактериалното число) на 1 ml сурово или пастьоризирано мляко се определя по формулата:

$\Sigma C$

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

където:

$\Sigma C$  е сумата от колонииите, изброени съгласно т. 8.1.1; ( $n_1 + 0,1 n_2$ )

$d$  - обемът на посятата проба, в която:

$n_1$  - броят на петрита, отчетени от първото разреждане;

$n_2$  - броят на петрита, отчетени от второто разреждане;

d - факторът на разреждане, от който са получени първите резултати. Резултатът се обработва допълнително до две значими числа. Ако числото, което трябва да се закръгли, е 5, закръглява се броят вляво от 5, за да се получи четно число.

8.1.3. Ако резултатите показват само брой на колонии, по-малък от 10, броят на микроорганизмите на милилитър се отчита като "по-малко от 10 x d на ml" (d е реципрочната стойност на фактора на най-ниското разреждане).

8.1.4. Ако резултатите отчитат само брой на колонии, по-голям от 300, при които изброяването е все пак възможно, се прави изчисление на определения брой и се умножава по реципрочната стойност на фактора за разреждане. Резултатът се записва като "Отчетен брой микроорганизми на милилитър".

8.2. Произведено по УНТ мляко и стерилизирано мляко Посевки с повече от 10 колонии при 0,1 ml се приема, че не отговарят на изискванията.

## Приложение № 7

към чл. 20, ал. 4

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

### Изброяване на соматичните клетки

Процедурата определя следните два референтни метода за определяне общия брой на соматичните клетки в суровото мляко: I. Микроскопски метод;

II. Флуоро-опти-електронен метод (Фоссоматик).

#### I. Микроскопски метод

1. Приложение С референтния метод се определя общият брой на соматичните клетки в суровото мляко. Процедурата определя метода за изброяване на клетъчните елементи в проба мляко за калибриране и проверка на точността на флуоро-опти-електронния метод (вж. т. II. 1).

2. Определение - соматични клетки са мононуклеарни левкоцити, полиморфонуклеарни левкоцити (неутрофилни, ацидофилни), мононуклеарни клетки (лимфоцити и моноцити) и епителните клетки, чиито ядра се различават ясно при оцветяване с метиленово синьо.

3. Принцип - 0,01 ml се поставя върху предметно стъкло с размери 1 cm<sup>2</sup>. Натривката се изсушава и оцветява. Изброяването се извършва с микроскоп. Броят на соматичните клетки, отчетен в даден сектор, се умножава по фактора на микроскопа, за да даде броя на клетъчните елементи в 1ml.

4. Реактиви Използват се реактиви ч.а.с Багрило - състав: метиленово синьо - 0,6 g; етанол (95 % V/V) - 54,0 ml; 1,1,1-трихлороетан или тетрахлоетан - 40,0 ml; ледена оцетна киселина - 6,0 ml. Внимание! Тетрахлороетанът е отровен. Приготвянето на разтвор от него и употребата му трябва

да се извършва в лабораторна камина. Приготвяне Посочените количества етанол и 1,1,1-трихлороетан или тетрахлороетан се разтварят в стъкло. Съдържанието се нагрява на водна баня до 60 - 70 °С. Добавя се метиленово синьо. Внимателно се разбърква и охлажда в хладилник до 4 °С за 12 до 24 часа, след което се прибавя ледената оцетна киселина. Багрилото се филтрира през филтър с порьозност от 10 до 12 микрона или по-малко. Съхранява се в плътно затворено стъкло. При образуването на седимент разтворът се филтрира отново преди употреба.

## 5. Апаратура и лабораторна стъклария

5.1. Микроскоп с увеличение от x 500 до x 1000.

5.2. Микропипета, 0,01 ml и точност  $\pm 2\%$  или по-голяма.

5.3. Индуктивна плака, с маркирана площ 20 mm x 5 mm или шаблон и подложка с маркирана площ за натривката 20 mm x 5 mm.

5.4. Нивелирана нагревателна плоча (30 - 50 °С) за изсушаване на натривките.

5.5. Сушилня за натривки

5.6. Водна баня, работеща при температура 30 - 40 °С, за нагряване на пробата с мляко.

5.7. Обект-микрометър с деления от 0,01 mm.

## 6. Процедура

6.1. Проба Пробата с мляко се изследва до шест часа след вземането ѝ. По време на съхранението температурата ѝ не трябва да надвишава 6 °С, като се внимава да не замръзне.

6.2. Лабораторна подготовка на пробата Пробата се нагрява във водна баня (т. 5.6) до температура 30 - 40 °С, след което внимателно се размесва и се охлажда до температурата, при която е била калибрирана с микропипета (т. 5.2) - например 20 °С.

6.3. Предварителна обработка на предметните стъкла Предметните стъкла (т. 5.3) се почистват с етанол, подсушават се с чиста хартия, опламеняват се и се охлаждат. За да не се напращат, стъклата се поставят за съхранение в кутии.

6.4. Подготовка на натривката 0,01 ml от предварително подготвената проба се всмуква с микропипета (т. 5.2), чиито външни стени се почистват внимателно от млякото. Пипетата се полага на предметното стъкло (т. 5.3), като първо се издухва фиксираното количество на площ с размери 20 mm x 5 mm и след това се разстила равномерно по маркираната площ. Натривката се оставя на нивелираната нагревателна плоча до пълното ѝ изсушаване. За всяка проба мляко се подготвят и изследват най-малко две натривки.

6.5. Оцветяване на натривките Натривките се потапят в багрилния разтвор (т. 4) за 10 минути. Изцеждат се и се изсушават при необходимост в сушилня за натривки (т. 5.5), след което се потапят в питейна вода до пълното отстраняване на неабсорбираното багрило. Изсушават се отново и се съхраняват на защитено от прах място.

6.6. Калибриране на зрителното поле на микроскопа Диаметърът на зрителното поле се определя чрез обект-микрометър (т. 5.7) в зависимост от избраното увеличение на микроскопа (x 500 до x 1000).

## 7. Изброяване и изчисляване на резултата

7.1. Изброяване на клетъчните елементи За целта се използва микроскоп (т. 5.1). Преброяват се всички ядрени клетки. Струпванията от клетки, без ядра, малките клетки (с големина на ядрото под 4  $\mu$ ) и частиците с клетъчен характер не се броят. Броят се мононуклеарни левкоцити, полиморфонуклеарни левкоцити (неутрофилни, ацидофилни), мононуклеарни клетки (лимфоцити и моноцити) и епителните клетки.

7.2. Минимален брой клетки, подлежащ на изброяване Тъй като определянето броя на соматични клетки чрез микроскоп може да се използва също така и за стандартизиране на автоматичното и механизираното броене, коефициентът на вариация на резултатите от идентични проби не може да превишава коефициента на вариация на електронните устройства. Коефициентът на вариация за проба с мляко, съдържаща 400 000 - 600 000 клетки/ml, не трябва да надвишава 5 %. За да удовлетвори критерия за повторяемост, броят на соматичните клетки, подлежащ на отчитане за всяка проба мляко, трябва да бъде поне равен на 400 съгласно разпределението на Поасон.

Разпределение на Поасон:

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

където:

M е средната стойност;

V - дисперсията на разпределението;

S - стандартното отклонение.

Коефициентът на вариация е:

$$s \times 100 \%$$

$$100 \%$$

$$100 \%$$

$$CV =$$

-----

или

CV =

-----

или

CV =

-----

M

s

корен квадратен от M

M - (средната стойност), която обозначава отчетения брой на клетъчните елементи (т. е. 400 за CV = 5 %).

7.3. Определяне фактора на микроскопа При 0,01 ml мляко факторът на микроскопа се определя съгласно т. 7.3.1 или 7.3.2.

7.3.1. Изброяване на ивици по натривката Дължината на всяка ивица, подлежаща на отчитане, е 5 mm. Широчината ѝ съответства на диаметъра на зрителното поле, определен с обект-микрометъра (т. 5.7).

20.100

Фактор на микроскопа = ----- ,

d b

където: 100 е броят на ивиците на микрометъра;

20 - броят на зрителните полета;

d - диаметърът на зрителното поле в милиметри, определен с обект-микрометър (т. 5.7);

b - броят на изцяло отчетените ивици.

7.3.2. Изброяване на зрителните полета в средната третина на натривката или с растер

20.5.100

12732

Фактор на микроскопа =

-----

=

-----

,

$\pi \cdot d^2 \cdot s$

$d^2 \cdot s$

-----

4

където:

$d$  е диаметърът на зрителното поле, определен с обект-микрометър (т. 5.7);

$s$  - броят на полетата; или

$x.y$

Фактор на микроскопа = ---- ,

$\pi.r^2$

където:

$x$  е площта на натривката (обикновено 100 mm<sup>2</sup>);

$y$  - 100 (умножава се при пресмятането на броя на соматичните клетки в 1 ml проба);

$r$  - радиусът на зрителното поле в mm (т. 5.7);

$\pi$  - 3,1416.

7.4. Изчисляване на клетъчното съдържание Клетъчното съдържание в 1 ml мляко се получава, като отчетеният брой на соматичните клетки (т. 7.1 и 7.2) се умножи по фактора на микроскопа.

7.5. Точност Коефициентът на вариация (вж. т. 7.2) не трябва да надвишава 5 %.

## II. Флуоро-опти-електронен метод

1. Приложение Процедурата определя референтния метод, който след съответното калибриране (вж. т. I.1) може да се използва за определяне броя на соматичните клетки в суровото мляко - в третирани или нетретирани с химически консерванти проби.

2. Определение За целите на този метод соматичните клетки се определят като частици с минимална интензивност на флуоресценция чрез оцветяването на ДНК в ядрото им.

3. Принцип Част от пробата (например 0,2 ml) се размесва добре с буферен и флуоресциращ разтвор. Част от сместа се наслоява върху въртящ се диск, който служи като масичка на микроскопа. Всяка клетка произвежда електрически импулс, който се усилва и записва. Броят на соматичните клетки се отчита в хиляди на милилитър.

4. Реактиви Реактивите трябва да бъдат ч.а.с химически субстанции. Използваната вода е дестилирана или дейонизирана с равностойна чистота.

4.1. Буферен разтвор Състав: калиево-водороден фталат - 51,0 g; калиева основа - 13,75 g; полиетиленгликол - моно - р(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фенил-етер (например тритон х-100), 1 % (v/v) - 10 ml; рН - 5,7 до 5,9; разрежда се с вода до обем 10 000 ml. Приготвяне на разтвора:

Смесват се отделните съставки. Херметически затворен, разтворът е годен за употреба до седем дни от приготвянето му.

4.2. Флуоресциращ разтвор (основен разтвор) Състав: етид - бромид - 1,0 g; разрежда с вода до обем 1000 ml. Приготвяне на разтвора Етид - бромидът се разтваря във вода. Херметически затворен в светлоустойчиво стъкло, разтворът е годен за употреба до два месеца от приготвянето му.

4.3. Флуоресциращ (работен) разтвор - 20 ml от основния разтвор (т. 4.2) се смесват с буфера в обем 1000 ml. Работният разтвор е годен за употреба до седем дни от приготвянето му.

4.4. Почистващ разтвор Състав: буферен разтвор (т. 4.1) - 10 ml; полиетиленгликол - моно - р- (1,1,3,3-тетраметилбутил)-фенил- етер (например тритон х-100), 1 % (v/v) - 10 ml; амоняк, 25 % (v/v) - 25 ml; разрежда се с вода в обем 10 000 ml. Приготвяне на разтвора Смесват се отделните съставки. Разтворът е годен за употреба до 30 дни след приготвянето му. Забележка. Съставът на реагентите може да варира в зависимост от използваната система на изброяване. Следват се точно инструкциите на производителя.

## 5. Апаратура и лабораторна стъклария

5.1. Отчитащо устройство (брояч), което работи на принципа на оптичната флуоресценция. Забележка. Преди употреба устройството се калибрира. Определят се корелацията между обема на частиците, подлежащи на изброяване, и граничният праг, над който се извършва отчитането. Калибрирането на апаратурата се осъществява в съответствие с указанията на фирмата-производител, като се използват проби, чието клетъчно съдържание е предварително установено чрез микроскопския метод (т. 1).

5.2. Водна баня с циркулация, работеща при температура  $40 \pm 1$  °C.

5.3. Епруветка с подходяща херметизираща запушалка и приблизителен обем 15 ml.

## 6. Проба с мляко

6.1. Пробата се съхранява в епруветка (т. 5.3) при температура до 6 °C. Ако изброяването се извърши на неконсервирано мляко в рамките на 24 часа след издояването със стар модел фоссоматик 90 или 215, може да се получат нереални резултати.

6.2. Консервиране Консервирането с химикали се извършва във възможно най-кратък срок до 24 часа след вземането на пробата. 6.2.1. Пробата се консервира със следните химически консерванти:

а) ортоборна киселина - крайната концентрация на ортоборната киселина не трябва да превишава 0,6 g/100 ml; така консервирана, пробата може да се съхранява в продължение на още 24 часа при температура от 6 до 12 °C;

б) калиев бихромат - крайната концентрация на калиевия бихромат не трябва да превишава 0,2 g/100 ml; така консервирана, пробата може да се съхранява в продължение на още 72 часа при температура от 6 до 12 °C;

в) натриев азид - пробата може да се консервира с натриев азид до получаването на крайна концентрация от 0,024 g/100 ml, ако непосредствено след вземането ѝ е била охладена до 4 - 6 °C (6 до 12 °C) и подложена на изследване за броя на клетъчните елементи и общ брой микроорганизми в нея до 48 часа от същия момент;

г) бронопол - пробата може да се консервира с бронопол до получаването на крайна концентрация от 0,05 g/100 ml, ако непосредствено след вземането ѝ е била охладена до температура 6 - 12 °C и е подложена на изследване за броя на клетъчните елементи до 72 часа от същия момент.

6.2.2. Третирана вече с ортоборна киселина, пробата може да бъде допълнително консервирана до 48 часа с калиев дихромат. Забележка. За третираните с калиев дихромат проби трябва да се спазват определените условия за изхвърляне на отпадъчните флуиди.

## 7. Процедура

7.1. Предварителна обработка на пробите След издояване млякото, определено за изследване, се съхранява при температура от 2 до 6 °C най-малко 24 часа. Не се препоръчва отчитането на пробите за брой на соматичните клетки в деня на издояване без предварителна обработка, защото това може да доведе до занижаване на резултатите. Ако подобно изследване все пак се налага, пробата се третира с калиев дихромат най-малко 3 часа (вж. т. 6.2.1).

7.2. Подготовка за преброяване Предварително третираната проба (вж. т. 7.1) или необработена все още проба, която е престояла поне един ден, се нагрива във водна баня (т. 5.2) до температура от около 40 °C. Съхранява се при стайна температура до началото на изследването.

7.3. Преброяване Преброяването се извършва с помощта на отчитащото устройство (брояч) (т. 5.1) до 15 мин след приключване на нагриването (вж. т. 7.2). Непосредствено преди изследването пробата се разбърква добре до получаването на хомогенно разпределение на соматичните клетки в нея. Допълнителното разреждане и подготовка на пробата се извършва автоматично в устройството.

8. Точност на определянето Няма определени числови стойности, удовлетворяващи критериите за повторимост ( $r$ ) и възпроизводимост ( $R$ ), от международно признати съвместни опити.

Регистрираните на национално ниво данни позволяват следните оценки: Брой на соматичните клетки между 400 000 и 500 000/ml:

а) стандартно отклонение на повторимостта:  $s_r = 20\ 000$  клетки/ml (равно на коефициент на вариация 5 - 4 %);

б) стандартно отклонение на възпроизводимостта:  $s_R = 40\ 000$  клетки/ml (равно на коефициент на вариация 10 - 8 %).

9. Проверка на точността на определяне Точността на определяне се проверява въз основа на проби с известно клетъчно съдържание, определено чрез отчитане броя на соматичните клетки, проведено в национална референтна лаборатория чрез микроскопския метод.

към чл. 20, ал. 4

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

#### Доказване на антибиотици и сулфонамиди

Приложение Процедурата определя референтния метод за доказване на антибиотици и сулфонамиди в суровото и топлиннообработеното мляко. Референтният метод включва:

I. Метод за качествено доказване наличието на антибиотици и сулфонамиди Метод за първоначално селектиране на пробите с мляко, които съдържат антибиотици, включващи сулфонамиди, който представлява част от серия сходни методи, използващи *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, щам ATCC 10149 като основен тест-организъм. Методът е представителен за серията от изследвания.

II. Метод за потвърждаване и идентификация на пеницилина Методът се използва за потвърждаване резултатите от метода за качествено доказване на пеницилина и определяне на концентрацията му.

#### I. Метод за качествено доказване

1. Приложение Методът определя начините за качествено доказване на антибиотици и сулфонамиди в суровото и топлиннообработеното мляко, превишаващи нормите, посочени в таблицата: Доловими концентрации на антибиотици и сулфонамиди (1)

#### Чувствителност на теста

всички

отрицателни всички

положителни

Бензилпеницилин	0,002	0,006
Ампицилин	0,002	0,005
Клоксацин	0,015	0,035
Нафцилин	0,006	0,011
Тетрациклин	0,10	0,40
Окситетрациклин	0,20	0,45
Хлортетрациклин	0,15	0,50
Хлорамфеникол	7,	15,
Дихидрострептомицин	4,	13,

Неомицин	1,	22,
Канамицин	9,	28,
Бацитрацин	0,06	0,14
Еритромицин	1,	2,25
Рифамицин	0,01	0,14
Диафенилсулфон	0,01	0,1
Сулфаметазин		
(Сулфадимидин)	0,5	1,

(1) Бензилпеницилинът и бацитрацинът се изразяват в IU/ml, докато всички останали антибиотици се представят в mg/ml.

2. Определение Млякото съдържа антибиотици или сулфонамиди, когато изследваната по описания метод хранителна среда не промени цвета си (вж. т. 7.1).

3. Принцип Пробата мляко заедно с хранителните съставки се добавя към агарна хранителна среда, съдържаща рН-индикатор и спори на *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, щам ATCC 10149 (вж. т. 5.4.1), който проявява много добра обща чувствителност и в частност чувствителност към инхибирането от пеницилин. Култивирането на средата, което води до нормален растеж на организмите и киселинообразуване, променя цвета на рН-индикатора от пурпурен в жълт. Наличието в млякото на потискащи растежа на организмите вещества не причинява промяна в пурпурния цвят на индикатора.

4. Апаратура и лабораторна стъклария Стандартно лабораторно оборудване:

4.1. Апаратура

4.1.1. Инкубатор (термостат), работещ при температура от  $64 \pm 1$  °C.

4.1.2. Водна баня, поддържаща температура от  $64 \pm 1$  °C.

4.1.3. Статив-решетка за епруветки или ампули.

4.1.4. Пипети с краища за еднократна употреба, подходящи за вземане на проби и дозиране на 0,1 ml.

4.1.5. Пинсети или щипци.

4.1.6. Сух стерилизатор, работещ при температура 170 до 175 °C.

4.1.7. Автоклав, поддържащ температура от  $121 \pm 1$  °C. 4.1.8. рН-метър.

4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Стъкла за пробите с подходящи запушалки Забележка. Използването на някои каучукови запушалки може да доведе до отлагането на инхибиторни вещества по гърлото на стъклото.

4.2.2. Петри от прозрачно безцветно стъкло или стерилен синтетичен материал с гладки дъна и равномерна дебелина на стъклото с вътрешен диаметър най-малко 140 mm.

4.2.3. Шишета с вместимост 250 ml.

4.2.4. Пипети (запушени с памук) от стъкло или стерилен синтетичен материал с вместимост 1 и 10 ml.

4.2.5. Стъклени шпатули

4.2.6. Епруветки или ампули с вътрешен диаметър около 8 mm, с капачки или запушалки.

4.2.7. Стерилизация на лабораторната стъклария  
Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в сух стерилизатор (т. 4.1.6) при температура 170 до 175 °C най-малко за един час;

б) в автоклав (т. 4.1.7) при температура  $121 \pm 1$  °C най-малко за 20 мин. При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията - например ако оборудването се стерилизира в контейнери, то не трябва да бъде плътно затворено, а колбите и стъклата трябва да бъдат с отворени капаци. Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата. Пипетите се стерилизират в сух стерилизатор.

5. Среди, разтвори, тест-организъм  
Съставките на хранителната среда трябва да отговарят на бактериологичните изисквания. Използваната вода трябва да бъде дестилирана в стъкло или деминерализирана с равностойна чистота, която не съдържа потискащи растежа на тест-организма вещества.

#### 5.1. Среди

5.1.1. Хранителен агар - полегат агар за поддържане на тест-микроорганизма  
Състав: дрождев екстракт - 2 g; пептон - 5 g; екстракт от месо - 1 g; натриев хлорид - 5 g; агар - 10 - 15 g; вода - 1000 ml. Приготвяне на средата  
Съставките се разтварят във вода. Разтворът се нагрява до кипене, като периодично се разклаща. Кorigира се pH, така че след стерилизацията да е  $7,4 \pm 0,1$  при температура 25 °C. Средата се разлива в количества от 10 ml в епруветки, за да се приготви впоследствие полегатият агар, или в стъкла по 100 ml. Стерилизира се в автоклав при температура  $121 \pm 1$  °C в продължение на 15 мин.

5.1.2. Агарова среда за доказване на антибиотици  
Състав: натриев хлорид - 2 g; агар - 15 g; вода - 1000 ml; разтвор на триметоприм или тетроксоприм (вж. т. 5.1.3) - 10 ml. Приготвяне на средата  
Всички съставки с изключение на триметоприма или тетроксоприма се разтварят във вода. Разтворът се нагрява до кипене, като периодично се разклаща. Добавя се триметопримът или тетроксопримът, след което се автоклавира при температура  $121 \pm 1$  °C в продължение на 15 мин. Кorigира се pH, така че след стерилизацията да е  $7,0 \pm 0,1$  при температура 25 °C.

5.1.3. Разтвор на триметоприм или тетроксоприм  
Състав: триметоприм - 5 mg, или тетроксоприм - 30 mg; етанол 96 % - 5 ml/30 ml; вода в количество до обем - 1000 ml. Приготвяне на разтвора  
Триметопримът или тетроксопримът се разтваря в етанол (5 или 30 ml) и се разрежда с вода.

5.1.4. Хранителна среда с индикатор Състав: дрождев екстракт - 0,75 mg; глюкоза - 5,0 mg; разтворимо нишесте - 8,0 mg; бромкрезол пурпур - 0,025 g; вода до обем - 50 ml. Приготвяне на средата Хранителните вещества и индикаторът се разтварят във вода при необходимост чрез нагриване. Разтворът се стерилизира чрез зайц-филтър. Хранителните вещества се предлагат в готов вид на пазара под формата на таблетки.

## 5.2. Стандартни пеницилинови разтвори

5.2.1. Приготвя се разтвор на пеницилин от 60 mg/ml (= 100 IU/ml) чрез разтварянето на натриев или калиев-бензил-пеницилин на кристали и стерилна дестилирана вода в стерилно стъкло, снабдено с подходяща запушалка.

5.2.2. Приготвя се работен разтвор на пеницилин, като 1,25 ml от стандартния пеницилинов разтвор (т. 5.2.1) се разрежда със стерилна дестилирана вода в обем 1000 ml. Работният разтвор съдържа 0,075 mg (= 0,125 IU/ml).

5.2.3. Приготвя се стандартен пеницилинов разтвор от 75 ml, съдържащ 0,004 mg/ml (= 0,0067 IU/ml), чрез добавянето и смесването на 71 ml свободно от инхибиторни вещества мляко (т. 5.3) и 4 ml от работния пеницилинов разтвор (т. 5.2.2).

5.2.4. Пеницилиновите разтвори, посочени в т. 5.2.1 - 5.2.3, се приготвят в деня на изследването.

5.3. Свободно от инхибиторни вещества мляко Приготвя се контролен разтвор на свободно от потискащи вещества мляко чрез възстановяването на обезмаслено мляко на прах (10 % m/v), предварително изследвано за отсъствието на инхибитори в стерилна дестилирана вода. Възможно е също така да се използва достатъчно количество мляко от сборна проба, за което е доказано, че е свободно от инхибиторни вещества. Млякото се разлива в стъкла и се нагрива в продължение на един час при температура 100 °C. Съхранява се в хладилник при температура 0 до 6 °C в продължение до една седмица.

5.4. Тест-организъм 5.4.1. Като тест-организъм се използва *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactus*, щам ATCC 10149, който е идентичен с щам C953. 5.4.2. За поддържане на тест-културата се приготвя бульонна култура. Тест-културата се поддържа върху полегат хранителен агар, посят с уxo (йозе) с бактериалната среда и инкубиран аеробно в продължение на 48 часа при температура  $63 \pm 1$  °C. След приключване на култивирането епруветката с полегатия агар се затваря херметически със стерилна каучукова запушалка. Така получената бульонна култура може да се съхранява до няколко месеца в хладилник при температура от 0 до 5 °C.

## 5.5. Тест-култура (спорова суспензия)

5.5.1. Двадесет ml от хранителния агар (т. 5.1.1) се прехвърля асептично в стерилно петри (т. 4.2.2), което се охлажда до стайна температура.

5.5.2. Пет ml стерилна дестилирана вода се прехвърля със стерилна пипета (т. 4.2.4) в епруветката с бульонната култура (т. 5.4.2) за отмиване на спорите от наклонения агар чрез стерилно уxo (йозе). Така получената спорова суспензия се съхранява при температура 0 до 5 °C и е годна за употреба до 36 часа след приготвянето ѝ.

5.5.3. Половин ml от споровата суспензия (т. 5.5.2) се прехвърля със стерилна пипета (т. 4.2.4) върху тест-културата (т. 5.5.1), като посявката се разстила равномерно по цялата повърхност с помощта на стъклено бастунче, след което се култивира при температура  $63 \pm 1$  °C (т. 4.1.1) в продължение на 16 до 18 часа. При използването на бульонна култура (т. 5.4.2) или култура, която е престояла повече от 36 часа, културата се опреснява най-малко два пъти, като интервалът между двете препосаявания не трябва да превишава 36 часа.

5.5.4. Десет ml дестилирана вода се прехвърля със стерилна пипета (т. 4.2.4) върху културата (т. 5.5.3), като спорите от повърхността се отстраняват в суспензията с помощта на стъклена пръчка. Споровата суспензия се прехвърля в стъкло (т. 4.2.3) с 250 ml стерилна дестилирана вода. Стъклото се затваря и разклаща. Култури, които не подлежат на незабавно опресняване, се съхраняват в хладилник при температура от 0 до 6 °C.

5.5.5. След култивиране на споровата суспензия върху агарна среда при температура  $63 \pm 1$  °C в продължение на 16 до 18 часа броят на жизнеспособните микроорганизми в нея трябва да е между 5 и 10 000 000/ml. Мътността на суспензията трябва да бъде еднородна. Култури, в които се наблюдават флокули (плуваща влакнеста утайка) или седимент, се изхвърлят. От бульонната култура (полегатия агар) (т. 5.4.2) се приготвя нова суспензия.

## 5.6. Подготовка на епруветките/ампулите

5.6.1. Агарната среда (т. 5.1.2) се разтапя и охлажда до 55 °C.

5.6.2. Една част от прясно приготвената спорова суспензия (т. 5.5.4) се прибавя към пет части от агарната среда в епруетка или стъкло (т. 5.6.1). Разбъркват се добре.

5.6.3. 0,3 ml от прясно приготвената, непосредствена среда (т. 5.6.2) се прехвърлят в стерилна епруетка или ампула (т. 4.2.6) до образуването на слой с дебелина 5 mm, след което последната се затваря със запушалка или капачка. Епруветките/ампулите се охлаждат изправени до втвърдяване на средата. Вече втвърдена, средата се оставя да престои за не по-малко от 12 часа. 5.6.4. Епруветките/ампулите могат да се използват същия ден или да бъдат съхранени за няколко месеца, ако се охладят непосредствено след приготвянето им при температура от 0 до 6 °C.

## 6. Процедура

6.1. Пробите се изследват в най-кратък срок - за предпочитане в рамките на 24 часа от вземането им, като междуременно се съхраняват при температура от 0 до 5 °C. В противен случай се замразяват дълбоко при -30 - -15 °C, за да се сведе до най-малко инактивацията на пеницилин.

6.2. Всяка епруетка/ампула (т. 5.6) се маркира четливо и по незаличим начин. След отстраняване на капачките или запушалките в статива-решетка (т. 4.1.3) се поставят необходимите за пробите и контролите (т. 5.2 и 5.3) епруетки/ампули. 6.3. Към всяка от епруветките/ампулите се добавя по 50 µl от хранителната среда (т. 5.1.4).

6.4. Пробата с мляко се размесва добре. 0,1 ml от нея се прехвърля в съответната маркирана епруетка/ампула с помощта на пипета (т. 4.1.4). За всяко прехвърляне се използва крайник за еднократна употреба.

6.5. Манипулациите, описани в т. 6.4, се повтарят, като вместо пробата с мляко (т. 5.2.3) се използва стандартен пеницилинов разтвор, съдържащ 0,004 mg/ml (=0,0067 IU/ml) пеницилин.

6.6. Манипулациите, описани в т. 6.4, се повтарят, като вместо пробата с мляко се използва контролният разтвор на свободно от инхибиторни вещества мляко (т. 5.3).

6.7. Епруветките/ампулите се затварят и поставят в статива-решетка, който се потапя във водна баня при температура  $63 \pm 1$  °C (т. 4.1.2) за период от 2 ч. и 30 мин. до 2 ч. и 45 мин.

6.8. Стативът-решетка с епруветките/ампулите се изважда от водната баня.

6.9. Изследва се оцветяването на тест-средата (т. 7).

## 7. Интерпретация на резултатите

7.1. Пурпурното оцветяване на тест-средата в пробата с мляко или епруветките/ампулите с контролата показва наличието на антибиотици или сулфонамиди на или около ниво "Всички положителни", представено в таблицата. Тест-средата е достатъчно чувствителна, ако пурпурното оцветяване на стандартния пеницилинов разтвор (т. 6.5) в епруветките/ампулите остане стабилно.

7.2. Пурпурното оцветяване само на част от тест-средата или неравномерното оцветяване в която и да било епруветка/ампула с пробата мляко показва наличието на инхибиторни вещества в пробата между нивата, представени в таблицата.

7.3. Оцветяването на тест-средата в пробата мляко или контролата в жълто показва отсъствието на потискащи тест-организма вещества.

7.4. Ако във всички изследвани епруветки/ампули, в т. ч. и отрицателната контрола, се наблюдава пурпурно оцветяване, тест-средата не съдържа жизнеспособни микроорганизми и пробите трябва да се подложат на повторно изследване, като за целта се приготви нов тест-материал.

## 8. Потвърждаване на резултатите

8.1. Пробите се потвърждават с описаните в т. 7.1 и 7.2 реакции в съответствие с метод II. Ако пробите с мляко не бъдат подложени веднага на тест за потвърждаване на резултатите, те се съхраняват дълбоко замразени, за да се избегне разграждането на антибиотиците.

## II. Метод за потвърждаване наличието на пеницилин и определяне на концентрацията му

1. Приложение Методът определя начините за потвърждаване наличието на пеницилин или различни от пеницилина антибиотици и за определяне концентрацията на пеницилин в проби, показали положителни или междинни реакции (метод I, т. 7.1 и 7.2). Чувствителността на различните антибиотици се определя по начините, описани в метод I, т. 1.

### 2. Определение

2.1. Ако около диска се появи светла зона с размери най-малко 2 mm, пробата мляко съдържа антибиотици и сулфонамиди.

2.2. Ако около диска с добавената към пробата мляко, която съдържа антибиотици, включващи сулфонамид (т. 2.1), пеницилиназа (беталакматаза), не се появи светла зона или се наблюдава

светла зона с по-малък диаметър от този на пробата без пеницилиназа, инхибиторното вещество е пеницилин или пеницилин и друг антибиотик, включващ сулфонамиди.

2.3. Ако зоната около диска не бъде инактивирана от пеницилиназата (т. 2.2), пробата мляко съдържа различен от пеницилина инхибитор. Някои полусинтетични пеницилини като натриевият клоксацилин не се инактивират, само частично се инактивират или са напълно устойчиви на пеницилиназата и следователно се определят като инхибитори, различни от пеницилина (т. 7.3).

3. Принцип Книжен филтърен диск, натопен в изследваното мляко, се поставя върху агарна среда, предварително засята с *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis*. Култивирането, което води до растеж на тест-организма, причинява помътняване на агара. Наличието на потискащи растежа на организма вещества в млякото се доказва с появата на светла зона около диска. Размерът на зоната зависи наред с други неща и от концентрацията и вида на инхибитора в млякото.

#### 4. Апаратура, лабораторна стъклария и оборудване

##### 4.1. Апаратура

4.1.1. Вж. метод I, т. 4.1.

4.1.2. Водна баня, работеща при температура  $80 \pm 1$  °C. 4.2. Лабораторна стъклария - вж. метод I, т. 4.2.

4.3. Книжни дискове, свободни от инхибитори, с диаметър 9 - 13 mm, с вместимост около 130 mg. Препоръчва се да се съхраняват в ексикатор.

5. Среди, стандартни разтвори, разтвор на пеницилиназата, реактиви, тест-организъм и др. Съставките на средата трябва да са подходящи за бактериологични изследвания. Използваната вода трябва да бъде стерилизирана в стъкло или деминерализирана с равностойна чистота и да не съдържа вещества, потискащи растежа на тест-организма.

##### 5.1. Среди

5.1.1. Хранителен агар (метод I, т. 5.1.1)

5.1.2. Тест-среда за доказване наличието на инхибиторни вещества Състав: дрождев екстракт - 2,5 g; триптон - 5 g; глюкоза - 1 g; разтвор на триметоприм или тетроксоприм (метод I, т. 5.1.3) - 10 ml; агар - 10 - 15 g (в зависимост от желиращите свойства на използвания агар); вода - 1000 ml.

Приготвяне на средата Твърдите съставки се разтварят напълно чрез нагряване и разбъркване.

Добавя се разтворът на триметоприм или тетроксоприм. Кorigира се рН, така че след стерилизацията да бъде равна на  $8,0 + 0,1$  при температура 25 °C. Средата се стерилизира в автоклав при температура  $121 \pm 1$  °C в продължение на 15 минути. 5.2. Стандартни пеницилинови разтвори - вж метод I, т. 5.2. За количественото определяне на инхибиторните вещества (т. 8) се приготвят стандартни пеницилинови разтвори в свободно от потискащи субстанции мляко (метод I, т. 5.3) в следните концентрации:

а) 0,004 mg/ml (0,0067 IU/ml);

б) 0,006 mg/ml (0,01 IU/ml);

в) 0,03 mg/ml (0,05 IU/ml);

г) 0,06 mg/ml (0,1 IU/ml).

### 5.3. Разтвор на пеницилиназа

5.3.1. Разтваря се пеницилиназа (беталакматаза) в стерилна дестилирана вода за получаването на концентрация 1000 U/ml. Разделен на малки части, разтворът може да се съхранява до две седмици при температура от 0 до 5 °C. Забележка. Няма установен международен стандарт за активността на пеницилиназата. Затова за целите на метода се приема, че 10 единици пеницилиназа са достатъчни да инактивират 0,6 mg (= 1 IU) пеницилин. Активността на отделните препарати трябва да бъде проверявана и ако не отговаря на гореописаните изисквания, съответно да се коригира концентрацията на пеницилиназата. 5.3.2. Вместо разтвор на пеницилиназа могат да се използват предлаганите на пазара готови дискове, като след проверка се установи, че съдържат необходимото количество пеницилиназа.

5.4. Тест-организъм - вж. метод I, т. 5.4.

5.5. Тест-култура (спорова суспензия) - вж метод А, т. 5.5.

### 5.6. Приготвяне на посевките за изследване

5.6.1. Тест-средата се разтапя за доказване на инхибиторни вещества (т. 5.1.2) и след това се охлажда до температура 55 °C.

5.6.2. В стъкло се прибавя една част от прясно приготвената спорова суспензия (т. 5.5) към толкова части от тест-средата (т. 5.1.2), колкото са необходими за получаване на необходимата плътност на колонии в незасятата тест-среда, след което съдържанието се размесва добре.

5.6.3. В предварително затоплено до 55 °C стерилно петриево блюдо (метод I, т. 4.2.2) се прехвърля достатъчно количество от непосятата тест-среда (т. 5.6.2) за образуването на слой с дебелина 0,6 до 0,8 mm. За получаването на слой с дебелина 0,8 mm в петри с вътрешен диаметър 140 mm са необходими около 15 ml от тест-средата.

5.6.4. Петритата се поставят отворени върху студена, предварително нивелирана хоризонтална повърхност до втвърдяване на агарната среда. След втвърдяването на средата петритата се затварят с капаци и се обръщат, така че кондензацията на вода по повърхността на средата да се намали до минимум.

5.6.5. За предпочитане е така приготвените посеви за изследване да бъдат използвани още същия ден. В противен случай те могат да се съхраняват в непосредствено запечатани след приготвянето им полиетиленови пликове при температура 5 °C до две седмици.

5.6.6. За да се улесни идентифицирането на посевките, дъното на петриевите панички се обозначава със съответната маркировка или номер.

## 6. Процедура

### 6.1. Подготовка на пробата

6.1.1. Проби с положителни или междинни реакции съгласно метод I (т. 7.1 и 7.2) подлежат на повторно изследване с цел идентифицирането и количественото определяне на пеницилина.

6.1.2. Първоначално въпросните проби се нагряват до температура  $80 \pm 1$  °C за 10 минути с цел да се избегне влиянието на термолабилни неспецифични инхибитори.

6.1.3. След като бъде добре размесено, 10 ml от предварително затопленото мляко за изследване се прехвърля в подходящо стъкло с широко гърло. Добавя се около 0,4 ml разтвор на пеницилиназа (т. 5.3) и се разбърква добре.

## 6.2. Доказване наличието на инхибиторни вещества

6.2.1. С помощта на сухи пинсети в пробата мляко (т. 6.1.2) се потапя книжен диск (т. 4.3). Излишното мляко се отстранява чрез притискане на диска към стената на стъклото с пробата. Дискът се поставя върху повърхността на посявката (т. 5.6) и се притиска леко с пинсетите.

6.2.2. Дискете, потопени в различните проби с мляко, трябва да се поставят на разстояние най-малко 20 mm един от друг и най-малко 10 mm от края на посявката.

6.2.3. За проверка на чувствителността дискете (т. 4.3), напоени със стандартен пеницилинов разтвор (т. 5.2), се поставят без определен ред между дискете, напоени с млякото за изследване, в съотношение 2:1. За всяко изследване се използват най-малко 5 диска със стандартен разтвор.

6.2.4. След като дискете се поставят върху агаровата среда без определен ред и се идентифицират, петритата с посевките се обръщат обратно и термостатират при температура  $63 \pm 1$  °C в продължение на 2 ч. и 30 мин. до 5 часа.

6.2.5. След култивиране посевките се изследват на подходяща светлина за образуване на зони на инхибиране около книжните дискове. Измерват се образувалите се около диска светли зони.

6.2.6. Зоните, образували се около диска, напоен със стандартен пеницилинов разтвор (т. 6.2.3), трябва да са с диаметър не по-малко от 2 mm. 6.2.7. Светлите зони около дискове, напоени с млякото за изследване, с диаметър, равен или по-голям от този, посочен в т. 6.2.6, показва наличието на потискащи растежа на тест-организма вещества.

## 6.3. Идентифициране и количествено определяне на инхибиторните вещества

6.3.1. Процедурата, описана в т. 6.2.1, се провежда чрез паралелни проби от предварително затопленото мляко за изследване (т. 6.1.2) и третираната с пеницилиназа проба (т. 6.1.3). Вместо разтвора, получен от прибавянето на пеницилиназа към 10 ml от пробата с мляко, може да бъде използван предварително приготвен с разтвор на пеницилиназа диск (т. 5.3.2), напоен с млякото за изследване и поставен върху посявката.

6.3.2. Процедурата, описана в т. 6.2.1, се провежда с паралелни проби за всеки стандартен пеницилинов разтвор, приготвен съгласно т. 5.2 (а - г). 6.3.3. Определят се средните диаметри на светлите зони на инхибиране както за пробата с мляко и контролата, съдържаща пеницилиназа, така и за стандартните пеницилинови разтвори.

## 7. Интерпретация на резултатите (вж. т. 2)

7.1. Ако около диска с контролния разтвор на пеницилиназа не се появи светла зона, но такава се образува около диска с пробата мляко, чийто диаметър е равен или по-голям от този на диска със

стандартния пеницилинов разтвор (т. 5.2, а), съдържащият се в пробата инхибитор съответства на концентрацията на натриев (калиев)-бензил-пеницилин от най-малко 0,004 mg/ml.

7.2. Ако средният диаметър на светлата зона около диска, напоен с разтвора на пеницилиназа, е равен на средния диаметър на светлата зона около диска, напоен с млякото, млякото съдържа потискащи вещества, които използваните в този метод концентрации на разтвора с пеницилиназа не могат да инактивират.

7.3. Ако средният размер на светлата зона около диска, напоен с разтвора на пеницилиназа, е по-малък от средния диаметър на светлата зона около диска, напоен с предварително нагрятата съгласно т. 6.1.2 проба мляко, освен пеницилин или полусинтетичен пеницилин, който не може да бъде идентифициран с използваната в този метод концентрация на пеницилиназата, млякото съдържа пеницилин и други антибиотици, включващи сулфонамиди. Синтетичните пеницилини като натриевия клоксацин например могат да не бъдат инактивирани от пеницилиназата при условията на опита и следователно могат да бъдат класифицирани като инхибитори, различни от пеницилина. Забележка. При необходимост за доказване наличието на различни от пеницилина инхибитори се използват подходящи за целта методи.

## 8. Определяне съдържанието на пеницилин

8.1. Съдържанието на пеницилин може да се определи чрез построяване на стандартна крива или да се изчисли въз основа на размерите на зоните, получени от стандартните пеницилинови разтвори в млякото (т. 5.2, а - г).

8.2. Построяване на стандартна крива Тъй като между  $\log_{10}$  на концентрацията на пеницилина и диаметъра на зоните на инхибиране съществува линейна зависимост, стандартната крива може да се построи на милиметрова хартия, като концентрацията на пеницилина се представи по ординатата, а зоните на инхибиране - по абсцисата. Зоните на инхибиране се изчисляват като средна стойност от паралелно проведените опити. Диаметрите на зоните се нанасят срещу различните стойности на концентрация на стандартните пеницилинови разтвори. Отделните точки се свързват, за да се получи стандартната крива.

8.3. Изчисляване на резултатите Различната концентрация на пеницилин в млякото се изчислява въз основа на диаметрите на зоните чрез подходящо уравнение или стандартната крива. За по-голяма точност на анализа радиусът на зоните на инхибиране трябва да е най-малко два пъти и най-много пет пъти по-голям от радиусите на дисковете.

## 9. Представяне на резултатите

9.1. Резултатите се представят като количество пеницилин, равно или надвишаващо 0,004 mg/ml (или чрез посочване на определената концентрация), или количество инхибитори, различни от пеницилина.

9.2. Повторяемост (r) и възпроизводимост (R) Няма значими числени стойности, тъй като се използва стандарт за сравнение.

към чл. 28, ал. 1, т. 2

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

## Определяне на фосфатазната активност

### 1. Приложение

Процедурата определя референтния метод за определяне на фосфатазната активност в пастъоризираното мляко.

### 2. Определение

Фосфатазната активност се определя от количеството на намиращата се в продукта активна алкална фосфатаза, изразена като количество фенол в микрограмове, отделен при описаните условия след влизане в реакция с 1 ml пастъоризирано мляко. Мляко с фосфатазна активност под 4 mg/ml се определя като фосфатазно отрицателно.

### 3. Принцип

Фосфатазната активност се определя от количеството фенол, освободен от динатриевия фенолфосфат, добавен към пробата. Освободеният фенол влиза в реакция с дибромохинон хлоримид и дава дибромоеиндофенол (синкав на цвят), който се измерва колометрично при дължина на вълната 610 nm. Прави се сравнение с пробата, съдържаща разрушения фосфатазен ензим.

### 4. Реактиви

#### 4.1. Буфер - бариева основа - борна киселина

4.1.1. 50,0 g бариева основа  $[Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O]$  се разтваря във вода и разтворът се довежда до обем 1000 ml.

4.1.2. 22,0 g борна киселина  $[H_3BO_3]$  се разтваря във вода и разтворът се довежда до обем 1000 ml.

4.1.3. 500 ml от всеки разтвор се загрява до 50 °C, след което разтворите се смесват добре, разбъркват се и бързо се охлаждат до 20 °C. При необходимост рН се коригира до  $10,6 \pm 0,1$  чрез добавянето на още разтвор (т. 4.1.1. или 4.1.2). Филтрира се и се съхранява в плътно затворен контейнер.

4.1.4. Преди употреба разтворът се разрежда с равен обем вода.

4.2. Буфер за проявяване на оцветяването 6,0 g натриев метаборат ( $\text{NaBO}_2$ ) или 12,6 g ( $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) се разтваря с 20,0 g натриев хлорид ( $\text{NaCl}$ ) във вода и разтворът се довежда до обем 1000 ml.

4.3. Буфер за оцветяване на разреждането 10 ml от буфера за проявяване на оцветяването (т. 4.2) се разрежда с вода до 100 ml. 4.4. Буферен субстрат 0,1 g свободен от обезводнен фенол динатриев фенилфосфат се разтваря в 100 ml буфер (т. 4.1.3) или 0,5 g динатриев фенилфосфат се разтваря в 4,5 ml буфер за проявяване на оцветяването (т. 4.2), прибавят се две капки дибромохинон хлоримид (т. 4.6 - BQC - разтвор) и се оставя да престои на стайна температура 30 мин. Полученото оцветяване се екстрахира с 2,5 ml бутан-1-ол и се оставя да престои до отделянето на субстанцията, след което последната се декантира и изхвърля. При необходимост екстракцията се повтаря. Разтворът може да се съхранява в хладилник за няколко дни. Преди употреба оцветяването се проявява и екстрахира отново. Буферният субстрат се приготвя непосредствено преди употреба, като 1 ml от този разтвор се разрежда с буферния разтвор (т. 4.1.3) до 100 ml.

4.5. Цинково-меден преципитант (утилителен агент) 3,0 g цинков сулфат ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) и 0,6 g меден (II) сулфат ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) се разтварят във вода и разтворът се довежда до обем от 100 ml.

4.6. 2,6-дибромхинон хлоримид (BQC - разтвор)  $40 \pm 1$  mg 2,6-дибромхинон хлоримид (BQC) ( $\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$ ) се разтваря в 10 ml етанол 96 % (v/v). Разтворът се съхранява в тъмно стъкло в хладилник. При промяна в цвета или при престой повече от един месец се изхвърля.

4.7. Разтвор на меден сулфат 0,05 g меден (II) сулфат ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) се разтваря във вода и разтворът се довежда до обем от 100 ml.

4.8. Стандартен фенолов разтвор

4.8.1. Претегля се  $200 \pm 2$  mg чист безводен фенол и се прехвърля в мерителна колба от 100 ml. Фенолът се разтваря с вода, смесва се и се допълва до марката. Съхраняван в хладилник, основният разтвор е годен за употреба в продължение на няколко месеца.

4.8.2. 10 ml от основния разтвор се разреждат с вода до 100 ml. Разтворът се смесва добре. 1 ml съдържа 200 mg фенол.

5. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване:

5.1. Аналитични везни.

5.2. Водна баня с контролирана температура при  $37 \pm 1$  °C.

5.3. Спектрофотометър с възможност за отчитане при дължина на вълната от 610 nm.

5.4. Епруветки с размери 16 или 18 mm x 150 mm, градуирани за предпочитане на 5 и 10 ml.

5.5. Пипети.

5.6. Стъклені фунии с подходяща големина и диаметър 5 cm. 5.7. Сгънати филтри с диаметър не по-малък от 9 cm за средна скорост на филтрация.

5.8. Мерителни колби за подготовка на стандартни разтвори. Забележка: Лабораторната стъклария, запушалките и инструментите за вземане на проби трябва да бъдат внимателно почистени. Препоръчва се да се изплакнат с прясно преварена дестилирана вода или да се обработят с пара. Забранява се употребата на запушалки, направени от фенолни пластмаси, тъй като могат да причинят замърсяване с фенол.

## 6. Процедура

### 6.1. Подготовка на пробата за изследване

6.1.1. Анализът се извършва веднага след вземане на пробата. В противен случай пробата се съхранява в хладилник. Забележка: По време на определянето да се избягва влиянието на пряката слънчева светлина. Да се избягва замърсяването със следи от слюнка или пот, тъй като води до неточни положителни резултати. Специално внимание се обръща на пипетирането.

6.2. Тест-порция С помощта на пипета се поставя по 1 ml от пробата за изследване в две епруветки (т. 5.4), една от които служи за провеждане на контролата или празната проба.

### 6.3. Определяне

6.3.1. Празната проба се нагрива в кипяща вода две минути; епруветката и бехеровата чаша с кипяща вода се покриват с алуминиево фолио, за да се загрее цялата епруветка. Охлажда се бързо до стайна температура.

6.3.2. До края на процедурата празната проба и пробата за изследване се третират по един и същ начин. Прибавя се по 10 ml от буферния субстрат (т. 4.4) и съдържанието се размесва добре.

6.3.3. Пробите се поставят незабавно във водна баня (т. 5.2) за 60 мин., като съдържанието им периодично (не по-малко от 4 пъти) се разбърква.

6.3.4. Епруветките се нагриват на кипяща вода за две минути, както е описано в т. 6.3.1, след което се охлаждат бързо до стайна температура.

6.3.5. Към всяка епруветка се прибавя по 1 ml от цинково-медния преципитант (т. 4.5) и съдържанието се разбърква добре.

6.3.6. Филтрира се през суха филтърна хартия. Първите 2 ml се изхвърлят. При необходимост се филтрира отново до пълното избистряне на филтратата. 5 ml от бистрия филтрат се поставят в епруветка.

6.3.7. Прибавя се 5 ml от буфера за проявяване на оцветяването (т. 4.2).

6.3.8. Добавя се 0,1 ml от ВQC-разтвора (т. 4.6) и съдържанието се смесва добре. Оцветяването се проявява на стайна температура в продължение на 30 мин.

6.3.9. Оптическата плътност се измерва чрез сравнение с контролната или празната проба в спектрофотометър (т. 5.3) при дължина на вълната 610 nm.

6.3.10. Определянето се повтаря с подходящо разреждане на пробата, ако измерената съгласно т. 6.3.9 оптическа плътност е по-висока от тази на еталона, съдържащ 20 mg фенол във всяка епруветка, определен в съответствие с т. 6.4.4. Разреждането се приготвя чрез смесването на един обем от пробата за изследване с подходящ обем на част от същата проба, внимателно нагreti до кипене за инактивиране на фосфатазата.

6.4. Построяване на стандартна (калибрационна) крива

6.4.1. Приготвя се подходяща серия от разредени стандартни разтвори, като се започва от стандартния фенолов разтвор, съдържащ 0 (контрола или празна проба), 2, 5, 10 и 20 mg фенол на милилитър. В пет епруветки се отмерват съответно по 1 ml вода и 1 ml от четирите стандартни фенолови разтвора.

6.4.2. Към всяка епруветка се добавят 1 ml разтвор на меден (II) сулфат (т. 4.7), 5 ml от буфера за оцветяване на разреждането (т. 4.3), 3 ml вода и 0,1 ml ВQC- разтвор (т. 4.6), след което съдържанието се смесва.

6.4.3. Оцветяването се проявява за 30 мин. на стайна температура.

6.4.4. Оптическата плътност се измерва чрез сравнение с контролната или празната проба в спектрофотометър при дължина на вълната 610 nm (т. 5.3).

6.4.5. Изчислява се получената регресия чрез най-малкия корен квадратен въз основа на получените за всяко добавено количество фенол (т. 6.4.1) стойности на оптическата плътност (т. 6.4.4).

7. Изчисляване на резултатите

7.1. Изчисления и формули

7.1.1. Количеството фенол се изчислява въз основа на стойността на оптическата плътност, отчетена в т. 6.3.9, като се използва получената регресия (т. 6.4.5).

7.1.2. Фосфатазната активност на пастьоризираното мляко, изразена в микрограмовете фенол на милилитър, се изчислява по формулата:

Фосфатазна активност =  $2,4 \times A \times D$ ,

където:

A е количеството фенол в микрограмовете, получено по т. 7.1.1;

D - факторът на разреждане на разтворите по т. 6.3.10; при неразредени проби D = 1;

2,4 - факторът на разреждане (5/12 от 1 ml проба за изследване). Виж т. 6.2 във връзка с т. 6.3.2, 6.3.5 и 6.3.6. 7.2. Точност на определянето

7.2.1. Повторяемост (r): 2 µg фенол/ml.

7.2.2. Възпроизводимост (R): 3 (предварително) µg фенол/ml.

7.2.3. При разреждане на пробите (т. 6.3.10) пределната стойност, определена в т. 7.2.1 и 7.2.2, се отнася за резултатите, получени при използването на разреждана проба.

Приложение № 10

към чл. 28, ал. 1, т. 2

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Определяне на пероксидазната активност

### 1. Приложение

Процедурата определя референтния метод за определяне активността на ензима пероксидаза като критерий за ефективността на пастьоризацията.

### 2. Определение

Положителна реакция - когато млякото е правилно пастьоризирано, след разбъркване в рамките на 30 сек. се появява синьо оцветяване. Отрицателна реакция - след разбъркване цветът на изследваната проба не се променя.

### 3. Принцип

Ензимът пероксидаза разлага въглеродния прекис. Освободеният кислород окислява безцветния 1,4-фенилендиамин в пурпурен индофенол (тест на Сторч). Интензивността на цвета е пропорционална на концентрацията на ензима.

### 4. Реактиви

4.1. Разтвор на 1,4-фенилендиамин 2 g 1,4-фенилендиамин (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) се разтваря в топла вода (50 °C). Разтворът се довежда до обем 100 ml. Съхранява се в кафяво шише със стъклена запушалка на тъмно и хладно място. След като бъде приготвен, разтворът на 1,4-фенилендиамин образува седимент в рамките на ден или два. При появата на утайка разтворът се изхвърля.

4.2. Разтвор на въглероден прекис 9 ml въглероден прекис (30 %) се разрежда с вода и довежда до обем 100 ml. Разтворът се стабилизира с концентрирана сярна киселина - 1 ml/l разтвор. Разтворът

на въглероден прекис е годен за употреба в продължение на 1 месец, ако се съхранява на тъмно и хладно място в бутилка със стъклена запушалка, предотвратяваща какъвто и да било контакт с органични вещества.

## 5. Процедура

5.1. 5 ml от изследваното мляко се поставят в чиста епруветка с подходяща запушалка.

5.2. Прибавя се 5 ml 1,4-фенилендиамин (т. 4.1).

5.3. Добавят се две капки въглероден прекис (т. 4.2).

5.4. След разбъркване се следи за появата на оцветяване. Реакцията се определя като неспецифична, ако синьото оцветяване се появи 30 сек. след добавянето на реактивите.

## Приложение № 11

към чл. 28, ал. 2

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Изброяване на общ брой психротрофни микроорганизми (бърза техника на броене на колонии) за 25 часа при 21 °C

### 1. Приложение

Процедурата определя референтния метод за изброяване на микроорганизмите чрез метода за изброяване на колонии при температура 21 °C за пастьоризираното мляко след 5-дневна култивация при температура 6 °C с цел определяне степента на замърсяване с психотрофни микроорганизми, способни да се размножават при температура 6 °C.

### 2. Определение

Под "микроорганизми" се разбира микроорганизми, способни да образуват изброими колонии при аеробно култивиране при описаните условия.

### 3. Принцип

Пастьоризираното мляко се инкубира при температура 6 °C в продължение на пет дни. Определен обем от пробата с мляко за изследване се смесва с хранителна среда в петриевы панички и се инкубира при температура 21 °C в продължение на 25 часа. Определя се броят на

колонообразуващите единици и се изчислява общият брой на микроорганизмите в 1 ml пастъоризирано мляко.

#### 4. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване:

##### 4.1. Апаратура

4.1.1. Стерилизатор на горещ въздух при температура от 170 до 175 °C.

4.1.2. Автоклав, работещ при температура  $121 \pm 1$  °C.

4.1.3. Инкубатор (термостат), който поддържа температура:

а)  $6 \pm 0,2$  °C ;

б)  $21 \pm 1$  °C в цялото работно пространство.

4.1.4. рН-метър с компенсация на температурата и точност  $\pm 0,1$  рН.

4.1.5. Водна баня с регулатор на температурата при  $45 \pm 1$  °C.

4.1.6. Лупа с увеличение 2 - 4x.

4.1.7. Лупа с увеличение 8 - 10x.

4.1.8. Броителна камера/регистриращ брояч.

4.1.9. Миксер за разбъркване на 1 ml от пробата или десетократно разреждане с 9 ml разредител, работещ на принципа на ексцентричната ротация.

##### 4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Епруветки с подходящи запушалки и пространство за разбъркване на съдържанието и вместимост за 10 ml основно разреждане или други десетократни разреждания.

4.2.2. Колби с вместимост от 150 до 250 ml или епруветки с приблизителна вместимост от 20 ml за хранителната среда.

4.2.3. Пипети (с памучни запушалки) от стъкло или стерилен синтетичен материал със здрав край, с номинална вместимост от 1 ml и отвор с диаметър 1,75 до 3 mm.

4.2.4. Петри от безцветно прозрачно стъкло или стерилен синтетичен материал, с вътрешен диаметър на долната паничка от около 90 - 100 mm и дълбочина най-малко 10 mm. Дъното трябва да бъде гладко, за да не пречи на точното преброяване на колонии. 4.2.5. Стерилизация на лабораторната стъклария  
Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини: а) в сушилня на горещ въздух при температура от 170 до 175 °C за не по-малко от един час (т. 4.1.1); б) в автоклав (т. 4.2.1) при температура  $121 \pm 1$  °C за не по-малко от 20 мин. При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията. Така например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, те не трябва да бъдат плътно затворени, а колбите

трябва да са с отворени капаци. Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата. Пипетите се стерилизират в сушилня на горещ въздух (т. 4.1.1).

## 5. Хранителна среда - агар за изброяване на микроорганизмите

5.1. Състав на средата: дрождев екстракт - 2,5 g; триптон - 5,0 g; глюкоза D (+) или декстроза - 1,0 g; обезмаслено мляко на прах - 1,0 g; агар - 10 до 15 g в зависимост от желиращите свойства на използвания агар; вода - 1000 ml. Обезмасленото мляко на прах трябва да бъде свободно от инхибиторни вещества, което се определя чрез сравнителни изследвания, ползващи обезмаслено мляко на прах, за което се знае, че е свободно от инхибитори. Приготвяне на хранителната среда Съставките се суспендират и разтварят във водата в следната последователност: дрождев екстракт, триптон, глюкоза, обезмасленото мляко на прах. Нагряването на суспенсията улеснява манипулацията. Прибавя се агарът и се нагрява до кипене, като непрекъснато се разбърква до пълното му разтваряне или се разтваря на пара в продължение на 30 мин. При необходимост се филтрира през филтърна хартия. С рН-метър (т. 4.1.4) се проверява активната киселинност на средата и при необходимост се коригира, така че след стерилизацията тя да е равна на  $6,9 \pm 0,1$  при температура 25 °C, като се използва разтвор (не по-малко от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина.

5.2. Разпределяне, стерилизация и съхранение на хранителната среда Средата (т. 5.1) се разлива в количества по 100 - 150 ml в колби или 12 - 15 ml в епруветки (т. 4.2.2), след което съдовете се затварят със запушалки и се стерилизират в автоклав (т. 4.1.2) при температура  $121 \pm 1$  °C за 15 минути. Проверява се рН на средата. Ако не бъде използвана веднага, хранителната среда се съхранява на тъмно при температура между 1 и 5 °C до един месец след приготвянето ѝ.

5.3. Готова суха хранителна среда Хранителната среда (т. 5.1) може да бъде приготвена и от готова суха среда, като се спазват указанията на производителя. Ако средата не съдържа в състава си обезмаслено мляко на прах, то се прибавя непосредствено преди разтварянето. Коригира се рН на  $6,9 \pm 0,1$  при температура 25 °C, както е описано в т. 5.1, след което средата се поставя в съответните съдове, стерилизира се и се съхранява по указанията в т. 5.2 начини.

## 6. Разредители

### 6.1. Пептон-солов разтвор

Състав - пептон - 1,0 g; натриев хлорид (NaCl) - 8,5 g; вода - 1000 ml. Приготвяне Съставките се разтварят във вода. При необходимост полученият разтвор се нагрява. С рН-метър (т. 4.1.4) се проверява активната киселинност на разредителя и при необходимост се коригира така, че след стерилизацията да е равна на  $7,0 \pm 0,1$  при температура 25 °C, като се използва разтвор (не по-малко от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина.

### 6.2. Разпределяне, стерилизация и съхранение на разредителя

Разредителят (т. 6.1) се пресипва в епруветки (т. 4.2.1) в такива количества, че след стерилизация обемът му да е равен на  $9,0 \pm 0,2$  ml, след което епруветките се затварят със запушалки и се

стерилизират в автоклав (т. 4.1.2) при температура  $121 \pm 1$  °C в продължение на 15 мин. Проверява се рН на разредителя. Ако не се използват веднага, разредителят се съхранява на тъмно при температура между 1 и 5 °C до един месец след приготвянето му.

### 6.3. Готов сух разредител

Разредителят (т. 6.1) може да бъде приготвен и от готови таблетки или прах при спазване указанията на производителя. Коригира се рН на разредителя, както е описано в т. 6.1, и се разпределя в съдове, стерилизира се и се съхранява по указанияте в т. 6.2 начини.

## 7. Процедура

### 7.1. Разтапяне на хранителната среда

Необходимото количество среда се разтапя бързо и се темперира на водна баня (т. 4.1.5) до  $45 \pm 1$  °C преди началото на микробиологичното изследване.

### 7.2. Подготовка на пробата мляко

7.2.1. Инкубира се неотворена опаковка пастьоризирано мляко или ако това е невъзможно, представителна проба, съдържаща не по-малко от 100 ml мляко, в продължение на  $120 \pm 2$  часа при температура  $6 \pm 0,5$  °C в термостат (т. 4.1.3, а).

7.2.2. След инкубацията пробата мляко се размесва добре, така че да се осигури възможно най-равномерно разпределение на микроорганизмите чрез бързо 25-кратно обръщане на контейнера с пробата, като се избягва образуването на пяна или ако има такава, тя се оставя да се диспергира. Времето между смесването на пробата и отпипетирането на тест-порцията не трябва да превишава три минути.

### 7.3. Приготвяне на основното разреждане (10-1)

1 ml от пробата (т. 7.2.2) се прехвърля със стерилна пипета (т. 4.2.3) в 9 ml разредител (т. 6.1), като се внимава пипетата и разредителят да не влязат в контакт. Температурата на разредителя трябва да бъде приблизително равна на температурата на пробата с мляко. Съдържанието на основното разреждане се размесва внимателно с миксер (т. 4.1.9) за около 5 - 10 секунди. Получава се първоначално разреждане 10-1.

### 7.4. Приготвяне на следващи десетократни разреждания

За получаването на десетократни разреждания

1 ml от основното разреждане (т. 7.3) се прехвърля чрез стерилна пипета (т. 4.2.3) в 9 ml от разредителя (т. 6.1), като се спазват указанията, дадени в т. 7.3. Получава се първоначално разреждане 10-2. Приготвянето на допълнителни десетократни разреждания се извършва с нова стерилна пипета чрез повторение на същите манипулации до получаването на съответния очакван брой микроорганизми (т. 8.1).

### 7.5. Инокулиране на петриевите панички

1 ml от пробата и/или съответното десетократно разреждане се прехвърлят в петриева паничка (т. 4.2.4) със стерилна пипета (т. 4.2.3). На изследване подлежат най-малко две разреждания. Приготвят се две петри от всяко десетократно разреждане (т. 8.1).

#### 7.6. Разливане в петриеви панички

Върху посевките във всяка петриева паничка се разливат от 15 до 18 ml от средата (т. 7.1). Непосредствено след разливането ѝ хранителната среда се размесва с инокулума в петритото чрез кръгообразни движения, за да се получи равномерно разсейване на coloniите след инкубация. Времето между окончателното приготвяне на пробата мляко и смесването на разредителя със средата не трябва да превишава 15 минути. Петритата се поставят на чиста, хладна хоризонтална повърхност до втвърдяване на съдържанието.

#### 7.7. Инкубиране на петриевите панички

Петритата се поставят в инкубатор (т. 4.1.3, б), култивират се обърнати не повече от шест една върху друга, разделени помежду си и от стените и тавана на инкубатора, при температура  $21 \pm 1$  °C в продължение на 25 часа.

#### 7.8. Изброяване на coloniите

Изброяват се coloniите в петрита, съдържащи не повече от 300 coloniи. Петритата се изследват на непряка светлина. За улесняване на изброяването може да се ползва лупа (т. 4.1.6) и/или броителна камера (т. 4.1.8). Специално внимание трябва да се обърне на частиците от утаечни вещества в петрита, които не трябва да се бъркат с coloniите с формата на глава на топълйка (точковидни coloniи). За различаване на coloniите от чуждите тела съмнителните обекти се изследват внимателно при необходимост с помощта на лупа с по-голямо увеличение (т. 4.1.7). Разлети или слети coloniи се броят като една. Ако разливането е обхванало по-малко от една четвърт от петриевата паничка, изброява се броят на coloniите в незасегната повърхност на петритото, след което се изчислява съответното число за цялото петри. Ако е покрита по-голяма част от една четвърт от повърхността на петритото, броенето не се извършва.

### 8. Изчисляване на резултатите

8.1. Използват се резултатите от всички петриеви панички, съдържащи между 10 и 300 coloniи (вж. т. 8.3 и 8.4).

8.2. Броят на колонообразуващите единици на микроорганизмите (бактериалното число) на 1 ml пастеризирано мляко се определя по формулата:

$\Sigma C$

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

( $n_1 + 0,1 n_2$ ) d където:

## Σ C e

сумата от колониите, изброени съгласно т. 8.1.1; ( $n_1 + 0,1 n_2$ ) d - обемът на посятата проба, в която:

n1 - броят на петрита, отчетени от първото разреждане;

n2 - броят на петрита, отчетени от второто разреждане;

d - факторът на разреждане, от който са получени първите резултати. Резултатът се обработва допълнително до две значими числа. Ако числото, което трябва да се закръгли, е 5, закръглява се броят вляво от 5, за да се получи четно число.

8.3. Ако резултатите показват брой на колониите само по-малък от 10, броят на микроорганизмите на милилитър се отчита като "по-малко от  $10 \times d$  на ml", като d е реципрочната стойност на фактора на най-ниското разреждане.

8.4. Ако резултатите отчитат само брой на колониите, по-голям от 300, при които изброяването е възможно, се прави изчисление на определения брой и се умножава по реципрочната стойност на фактора за разреждане. Резултатът се записва като "отчетен брой микроорганизми на милилитър".

### Приложение № 12

към чл. 28, ал. 2

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Изброяване на колиформни след култивиране при температура 30 °C

#### 1. Приложение

Процедурата определя референтния метод за изброяване на колиформни в пастьоризираното мляко чрез изброяване на колониите след култивиране при температура 30 °C

#### 2. Определение

Под "колиформни" се разбира бактерии, които при температура 30 °C образуват характерни или нехарактерни колонии, които усвояват лактоза с отделянето на газ при описаните условия на изследване.

#### 3. Принцип

Определен обем от пробата с мляко се смесва с хранителната среда в петриеви блюда и се култивира при температура 30 °С в продължение на 24 часа. Изброяват се характерните колонии и при необходимост наличието на нехарактерни колонии се потвърждава чрез изследване на способността им да усвояват лактоза с отделяне на газ. Изчислява се броят на колиформите в 1 ml пастьоризирано мляко.

#### 4. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване:

##### 4.1. Апаратура

4.1.1. Сух стерилизатор, работещ при температура 170 до 175 °С.

4.1.2. Автоклав, работещ при температура  $121 \pm 1$  °С.

4.1.3. Инкубатор (термостат), поддържащ температура от  $30 \pm 1$  °С в целия си работен обем.

4.1.4. рН-метър с точност до  $\pm 0,1$  рН единици и компенсатор на температурата.

4.1.5. Водна баня, работеща при температура  $45 \pm 1$  °С.

4.1.6. Йозе, платинено-иридиево или хром-никелово.

##### 4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Епруветки с подходящи запушалки и вместимост 20 ml за побиране на средата за потвърждаване (т. 5.2) и ферментационни епруветки на Дърхам (видалови епруветки) с подходящи размери.

4.2.2. Колби с вместимост 150 - 250 ml за твърдата селективна среда (т. 5.1).

4.2.3. Пипети (запушени с памук) от стъкло и стерилен синтетичен материал, със здрав край с номинален обем 1 - 10 ml и диаметър на изходния отвор 1,75 до 3 mm.

4.2.4. Петри от безцветно прозрачно стъкло или стерилен синтетичен материал с вътрешен диаметър на долното блюдо от около 90 - 100 mm и дълбочина най-малко 10 mm. Дъното трябва да бъде гладко, за да не пречи на точното изброяване на колониите. 4.2.5. Стерилизация на лабораторната стъклария  
Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в сух стерилизатор при температура от 170 до 175 °С за не по-малко от един час (т. 4.1.1);

б) в автоклав (т. 4.2.1) при температура  $121 \pm 1$  °С за не по-малко от 20 мин. При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията. Така например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, те не трябва да са плътно затворени, а колбите трябва да са с отворени капаци. Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата. Пипетите се стерилизират в сушилня на горещ въздух (т. 4.1.1).

#### 5. Хранителна среда

### 5.1. Виолетово-червен лактозо-жлъчен агар (ВЧЛЖ- агар) - твърда селективна среда

Състав на хранителната среда: пептон - 7 g; дрождев екстракт - 3 g; лактоза (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>.H<sub>2</sub>O) - 10 g; натриев хлорид (NaCl) - 5 g; жлъчни соли - 1,5 g; неутрално червено - 0,03 g; кристалвиолет - 0,002 g; агар - 10 до 15 g в зависимост от желиращите качества на използвания агар; вода - 1000 ml. Приготвяне на средата Съставките се разтварят във водата и се оставят за няколко минути, след което енергично се разбъркват. С рН-метър (т. 4.1.4) се проверява рН на средата и при необходимост се коригира така, че след кипене да е равна на  $7,4 \pm 0,1$  при температура 25 °С, като се използва разтвор (с концентрация не по-малка от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина. Средата се нагрява бързо до кипене, като периодично се разклаща, след което незабавно се разлива в количества от 100 до 150 ml в стерилни колби (т. 4.2.2) и се темперира на водна баня (т. 4.1.5) при температура от  $45 \pm 1$  °С. Стерилността на средата се проверява по време на употребата ѝ (вж. т. 6.4). Средата е годна за употреба до три часа след приготвянето ѝ.

### 5.2. Лактозо-жлъчен бульон с брилянтгрюн - среда за потвърждаване

Състав на хранителната среда: пептон - 10 g; лактоза (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>.H<sub>2</sub>O) - 10 g; суха говежда жлъчка - 20 g; брилянтгрюн - 0,0133 g; вода - 1000 ml. Приготвяне на средата Съставките на средата се разтварят във водата чрез нагряване до кипене. С рН-метър (т. 4.1.4) се проверява рН на средата и при необходимост се коригира така, че след стерилизацията да е равна на  $7,2 \pm 0,1$  при температура 25 °С, като се използва разтвор (с концентрация не по-малка от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина. Средата се разлива в количества от 10 ml в епруветки (т. 4.2.1), в които има поставени ферментационни епруветки на Дърхам, затварят се със запушалки и се стерилизират в автоклав (т. 4.1.2) при температура  $121 \pm 1$  °С в продължение на 15 мин. След стерилизацията във ферментационните епруветки на Дърхам не трябва да има мехурчета. Проверява се рН на средата. Ако не се използва веднага, хранителната среда се съхранява на тъмно при температура между 0 и 5 °С до един месец след приготвянето ѝ.

### 5.3. Готова суха хранителна среда

Хранителната среда (т. 5.1 и 5.2) може да е приготвена и от готова суха среда, като се спазват указанията на производителя. Проверява се рН, след което се разлива в съответните съдове, нагрява се до кипене или се стерилизира и съхранява по описаните в т. 5.1 и 5.2 начини.

## 6. Процедура

### 6.1. Хранителна среда

Средата (ВЧЛЖ- агар) се използва съгласно указанията в т. 5.1 начини.

### 6.2. Подготовка на пробата с мляко за изследване

Пробата с мляко се размесва добре чрез бързо 25-кратно обръщане на контейнера с пробата, за да се осигури възможно най-равномерно разпределение на микроорганизмите. Избягва се образуване на пяна или при наличието на такава тя се оставя да се диспергира. Времето между размесването на пробата и отпипетирането на тест-порцията не трябва да превишава 3 минути.

### 6.3. Инокулиране на петриевите блюда

Посяват се 3 ml от пробата с мляко (6.2) чрез прехвърляне на 1 ml във всяко от трите блюда (4.2.4) чрез стерилна пипета (4.2.3).

#### 6.4. Разливане

Във всяко от инокулираните петри се разлива около 12 ml хранителна среда ВЧЛЖ-агар (т. 6.1). Веднага след разливането ѝ хранителната среда се размесва с инокулума в петрито чрез кръгообразни движения, за да се получи равномерно разсейване на колониите след инкубация. Времето между окончателната подготовка на пробата с мляко и смесването на отпипетираната тест-порция със средата не трябва да превишава 15 мин. За проверка на стерилността се приготвя контрола от неинокулирано петриево блюдо с 12 ml ВЧЛЖ-агар, използван за посетите петри. Петритата се оставят върху чиста и хладна хоризонтална повърхност до втвърдяване на средата в тях. След пълното втвърдяване върху повърхността на инокулираната среда се наслоява нов слой от не по-малко от 4 ml ВЧЛЖ-агар (т. 6.1), който се оставя да се втвърди отново.

#### 6.5. Инкубиране на петриевите блюда

Петритата се поставят в инкубатор (т. 4.1.3). Култивират се обърнати с дъното нагоре не повече от шест на брой едно върху друго, разделени помежду си и от стените и тавана на инкубатора, при температура  $30 \pm 1$  °C в продължение на  $24 \pm 2$  часа.

#### 6.6. Изброяване на колониите

6.6.1. Изброяват се колиформите в петрите, чийто брой е от 10 до 150. Заобикалящият ги преципитат е с червена зона.

6.6.2. Ако всички или някои колонии покажат нехарактерна реакция (например различават се по цвят, размер или образуването на преципитат от типични колонии) се извършва тест за потвърждаване (т. 6.7).

#### 6.7. Тест за потвърждаване

Тестът за потвърждаване се извършва след определяне наличието на условията в т. 6.6.2 върху подходящ брой - три или пет например, нехарактерни колонии чрез посяване с йозе (т. 4.1.6) в епруветки на лактозо-жлъчен бульон с брилянтгрюн (т. 5.2), които се култивират при температура  $30 \pm 1$  °C в продължение на  $24 \pm 2$  часа. За колиформи се приемат колонните, които отделят газ във ферментационните епруветки на Дърхам.

### 7. Изчисляване на резултатите

7.1. Отчитат се посевките (вж. т. 7.4) от петрита, които съдържат повече от 150 колонии.

7.2. При извършване на тест за потвърждаване броят на колиформните колонии се изчислява въз основа на процента на доказаните колиформни колонии.

7.3. Броят на колиформите в 1 ml пастьоризирано мляко се определя по формулата:

$\Sigma C$

,

---

n

където:

$\Sigma C e$

общият брой на колониите на колиформните бактерии (вж. т. 7.1 във връзка с т. 7.2), получен при изследване на пробата мляко (3 ml);

n - количеството милилитри от изследваната проба (т. 6.3) (3 ml).

За изразяване на резултата при наличието само на повече от 100 колонии броят на колиформите се обработва до две значими числа. Когато числото, което се закръглява, е 5, числото вляво от него се закръглява така, че да се получи четно число.

7.4. Ако за посевките се отчита само брой на колониите, по-голям от 150, резултатът се записва като "Отчетен брой на колониите в 1 ml".

Приложение № 13

към чл. 28, ал. 2

(Ново, ДВ, бр. 111 от 2002 г.)

Доказване на патогенни микроорганизми

1. Приложение

Процедурата определя указанията за проверка на пастеризираното мляко за наличие на патогенни микроорганизми.

2. Определение

На изследване подлежат бактериалните видове, които са най-често срещани в предаваните чрез храни болести. Ако са изпълнени изискванията за броя на микроорганизмите при температура 30 °C и 21 °C, колиформите и фосфатазата, патогенността на микроорганизмите се доказва допълнително само при съмнение, че млякото е добито от животни, които са хранени със заразена храна.

### 3. Процедура

Използват се ISO-стандартите за изследване на топлинно преработени млечни продукти по отношение наличие на патогени.

### 4. Протокол от изследването

Резултатите от изследването на всеки отделен патогенен микроорганизъм се записват по следния начин: Брой в ml мляко, "наличие" или "отсъствие" на микроорганизми в задължителния за използвания метод обем пастьоризирано мляко. Протоколът трябва да съдържа ясно описание на използвания метод.