

MAGYAR ÉLELMISZERKÖNYV
Hivatalos Élelmiszervizsgálati
Módszergyűjtemény

Codex Alimentarius Hungaricus

3-1-91/180 számú előírás

A nyers- és a hőkezelt tej vizsgálati
módszerei

Methods of analysis and testing
of raw milk and heat-treated milk

Ezen előírás az Európai Közösségek Bizottságának 91/180/EGK határozata alapján készült.

This Regulation is equivalent in technical content to Commission Decision 91/180/EEC.

Jóváhagyta a Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, 2003.

A Magyar Élelmiszerkönyv előírásainak hatályára vonatkozó rendelkezéseket az élelmiszerekről szóló 1995. évi XC. törvény és a végrehajtására kiadott 1/1996. (I. 9.) FM-NM-IKM rendelet tartalmazza.

A Magyar Élelmiszerkönyv előírásait – az Európai Unió gyakorlatát követve – folyamatosan igazítják a fogyasztói igények változásaihoz, a tudomány és technika újabb eredményeihez. Ezért ezen előírás használata előtt győződjön meg arról, hogy a szöveg időközben nem változott-e.

A változásokat a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Értesítő közli. Az előírásokat az MSZT Szabványbolt (Budapest IX. Üllői út 25., levélcím: Budapest Pf. 24, 1450) árusítja.

MAGYAR ÉLELMISZERKÖNYV
Hivatalos Élelmiszer-vizsgálati Módszergyűjtemény

Codex Alimentarius Hungaricus

3-1-91/180 számú előírás

A nyers- és a hőkezelt tej vizsgálati módszerei

Methods of analysis and testing of raw milk and heat-treated milk

1. §

A nyerstejnek az alábbi jellemzőit vizsgálják referenciamódszerekkel:

- fagyáspont,
- mikrobaszám 30 °C-on,
- szomatikus sejtszám,
- antibiotikumok és szulfonamidok kimutatása.

2. §

A pasztörözött tejnek az alábbi jellemzőit vizsgálják referenciamódszerekkel:

- fagyáspont,
- foszfatáz aktivitás,
- peroxidáz aktivitás,
- mikrobaszám 30 °C-on,
- mikrobaszám 21 °C-on,
- Koliform szám 30 °C-on,
- antibiotikumok és szulfonamidok kimutatása,
- patogén mikrobaszám.

3. §

Az UHT és a pasztörözött tejnek az alábbi jellemzőit vizsgálják referenciamódszerekkel:

- fagyáspont,
- mikrobaszám 30 °C-on,
- antibiotikumok és szulfonamidok kimutatása.

4. §

A referenciamódszereket és a mintavételt az I. mellékletben ismertetett általános szabályok betartásával kell alkalmazni, illetve elvégezni.

5. §

A referenciamódszerek részletes szabályait a II. melléklet tartalmazza.

6. §

Ez az előírás 2004. január 1-jén lép hatályba.

I. MELLÉKLET

I. ÁLTALÁNOS SZABÁLYOK

1. Bevezetés

Ez a fejezet a reagensekre, az eszközökre, az eredmények megadására, a pontosságra és a vizsgálati jegyzőkönyvre vonatkozó azon általános előírásokat tartalmazza, amelyeket a tej mintavételét és vizsgálatát végző ellenőrző laboratóriumoknak be kell tartaniuk.

2. Reagensek

2.1. Víz

2.1.1. Ha nincs másképpen előírva, akkor az oldáshoz, a hígításhoz és a mosáshoz minden esetben desztillált vagy ioncserélt, vagy legalább azzal azonos tisztaságú sótlanított vizet kell használni. A mikrobiológiai vizsgálatokra használt víznek mentesnek kell lennie olyan anyagoktól, amelyek befolyásolhatják a mikroorganizmusok szaporodását a tesztelési körülmények között.

2.1.2. Ha nincs másképpen előírva, akkor az "oldáson" és a "hígításon" vizes oldás, illetve vizes hígítás értendő.

2.2. Vegyszerek

Ha nincs másképpen előírva, akkor valamennyi felhasznált vegyszer analitikai minőségű legyen.

3. Eszközök

3.1. Az eszközök jegyzéke

A különböző referenciamódszerek leírásában megadott eszközlista csak azokat tartalmazza, amelyek speciálisak, illetve különleges felhasználásúak.

3.2. Analitikai mérleg

Az "analitikai mérleg" 0,1 mg mérésére alkalmas mérleget jelent.

4. Az eredmények megadása

4.1. Eredmények

Ha nincs másképpen előírva, akkor a jegyzőkönyvben megadott eredmény két olyan vizsgálati eredmény számtani átlaga, amelyek kielégítik a módszer ismételtetőségi (5.1.1) követelményét.

Ha a vizsgálati eredmények az ismételtetőségi követelménynek nem felelnek meg, a vizsgálatot meg kell ismételni, vagy - ha nem lehetséges - az eredmény érvénytelen.

4.2. A százalékérték számítása

Ha nincs másképpen előírva, akkor az eredményt tömegszázalékban kell megadni.

5. Pontossági ismérvek

5.1. *A pontossági ismérvek az egyes módszerek esetében az ismételhetőség és az összehasonlíthatóság.*

- 5.1.1. Az ismételhetőség (r) akkor teljesül, ha ugyanazon eljárással, ugyanazon mintából, ugyanazon feltételek mellett (azonos vizsgáló személy, azonos eszközök, azonos laboratórium és rövid időintervallum) végzett, két egymást követő vizsgálat eredményének abszolút különbsége nem haladja meg az érvényes küszöbértéket.
- 5.1.2. Az összehasonlíthatóság (R) akkor teljesül, ha ugyanazon eljárással, ugyanazon mintából, különböző feltételek között (különböző vizsgáló személyek, különböző eszközök, különböző laboratóriumok és/vagy különböző időpontok) végzett két vizsgálat eredményének abszolút különbsége nem haladja meg a mindenkor érvényes küszöbértéket.
- 5.1.3. Ha nincs másképpen előírva, akkor az ismételhetőség és az összehasonlíthatóság küszöbértékére az ISO 5725:1986, 2. kiadása szerinti 95%-os valószínűségekre vonatkozó követelmények a mérvadók.
- 5.1.4. A szükséges körvizsgálatokat a vonatkozó nemzetközi irányelvek szerint kell tervezni és végrehajtani.

6. Vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyvben meg kell adni az alkalmazott eljárást, valamint a kapott eredményeket. Meg kell adni továbbá, az alkalmazott eljárás minden olyan részletét, amely nincsen rögzítve a vizsgálati módszer leírásában vagy választható, továbbá minden olyan körülményt, amely befolyásolhatta a kapott eredményeket. A jegyzőkönyvben meg kell adni a minta egyértelmű azonosításához szükséges valamennyi adatot.

II. A NYERS- ÉS A HŐKEZELT TEJ MINTAVÉTELE

1. Tárgy és alkalmazási terület

A leírás megadja a hőkezelt tej mintavételének, szállításának és tárolásának referenciamódszerét.

2. Általános előírások

A hőkezelt tej mintavételét szakképzett személynek kell végeznie, aki előzőleg megfelelő oktatásban részesült.

A vizsgálólaboratórium feladata, hogy a megbízott mintavevő személyt megfelelő utasításokkal lássa el a mintavételi technikára vonatkozóan azért, hogy a minta reprezentatív és a tétellel megegyező legyen.

Ugyancsak a vizsgáló laboratóriumnak kell utasítással ellátni a megbízott mintavevő személyt a minta jelölésére vonatkozóan annak érdekében, hogy a minta egyértelműen azonosítható legyen.

3. Mintavevő eszközök

3.1. Általános előírások

A mintavevő eszközök rozsdamentes acélból vagy más, megfelelő szilárdságú anyagból készüljenek és célszerűen kialakítottak legyenek. A nagy tartályokban lévő folyadékok keverésére szolgáló keverőt és keverő berendezést úgy kell méretezni, hogy az alkalmas legyen a folyadék megkeverésére anélkül, hogy a zsír avasodását okozná. A mintavevő nyele erős, megfelelő hosszú legyen, hogy a tartály bármely mélységéből mintát lehessen venni. A mintavevő edény térfogata legalább 50 ml legyen.

A mintavevő edények és a fedelük üvegből, megfelelő fémből vagy műanyagból készüljenek.

A mintavevő eszközök (beleértve az edényeket és a fedelet) anyagának nem szabad olyan változást előidéznie a mintában, amely befolyásolhatja a vizsgálati eredményeket. A mintavevő eszközök felülete tiszta, száraz, sima és karcmentes legyen, a sarkai pedig legyenek lekerekítve.

3.2. *Mintavevő eszközök mikrobiológiai célokra*

A mintavevő eszközök valamint az edények a fentiekén kívül sterilek legyenek.

Ha ugyanazon mintavevő eszközöket használjuk az egymást követő mintavételre, akkor a vizsgálólaboratórium vagy az illetékes hatóság által rögzített eljárások vagy útmutatók szerint minden mintavétel után tisztítandók és sterilizandók, amivel az egymást követő minták sértetlensége garantálható.

4. **Mintavételi technika**

4.1. *Általános előírások*

Az elvégzendő vizsgálatoktól függetlenül a tejet a mintavétel előtt kézzel vagy géppel alaposan össze kell keverni. A mintát közvetlenül a keverés után kell venni, amikor a tej még mozgásban van.

Ha tankban lévő tejet többféle vizsgálat céljára egyidejűleg mintázzák, először a mikrobiológiai mintát kell kivenni.

A minta mennyisége feleljen meg a vizsgálati igényeknek. A mintavevő edény térfogatát úgy kell megválasztani, hogy az edényt a minta csaknem teljesen kitöltse, azonban tartalmát a vizsgálat előtt megfelelően össze lehessen keverni, egyidejűleg kizárva a minta szállítás közbeni kiköpülődését.

4.2. *Kézi mintavétel*

4.2.1. Mintavétel tejes vödörből és kannából

A keveredés eléréséhez gyors mozdulatokkal mozgassuk a merülő keverőt fel és le a vödörben vagy a kannában, miközben meggyőződünk arról, hogy a tej alaposan összekeveredett, és nem tapad tejszín a kanna nyakához. A 4.2.4 pontnak megfelelően a teljes állományra nézve reprezentatív mintát kell begyűjteni.

4.2.2. Mintavétel hűtött termelői tejes tartályokból vagy kádakból

Gépi vagy kézi úton keverjük fel a tejet, míg a kívánt homogenitást elérjük. Ha a tej térfogata nem elegendő a gépi keveréshez, végezzünk kézi keverést.

4.2.3. Mintavétel mérőedényből

Fontos, hogy a tej megfelelően össze legyen keverve, amikor áttöltik a mérőedénybe. Szükséges lehet, hogy további kézi vagy gépi keverést alkalmazzunk, így biztosítva a tejszír egyenletes eloszlását. Amikor a mintavételezendő anyag mennyisége meghaladja a mérőedény úrtartalmát, a 4.2.4 pontnak megfelelően az egész állományra nézve reprezentatív mintát kell begyűjteni.

4.2.4. Megosztott mennyiség mintavétele

Amikor a mintavételi tejmennyiség több tartályban található, mindegyik tartályból reprezentatív mennyiséget kell venni, és fel kell jegyezni az egyes mintákhoz kapcsolódó tejmennyiséget. Hacsak az egyes tartályokból származó minták nem kerülnek külön-külön tesztelésre, keverjük

össze ezen reprezentatív mennyiségekből olyan adagokat, melyek arányosak azon tartályok mennyiségével, amelyből az egyes mintákat begyűjtötték. Keverés után vegyünk mintát (mintákat) ezekből az összesített arányos mennyiségekből.

4.2.5. Mintavétel nagy méretű edényekből – tároló, vasúti vagy közúti tartályokból

4.2.5.1. Mintavétel előtt megfelelő eljárással keverjük össze a tejet.

Nagy méretű edények vagy tároló, közúti vagy vasúti tartályok tartalmának összekeveréséhez javasolt a gépi keverés. (4.2.5.2)

A keverés alaposságának mértéke feleljen meg azon időtartamnak, ameddig a tej állt. Az alkalmazott keverési eljárás hatékonysága bármely körülmények között feleljen meg a tervezett elemzés céljainak; a keverés-hatékonysági kritérium nagymértékben befolyásolja azon minták elemzési eredményeinek hasonlóságát, amelyek a készlet különböző részeiből kerültek begyűjtésre, vagy kiengedéskor a tartály kivezető nyílásán keresztül, különböző intervallumokban. A tejkeverési eljárás akkor tekinthető hatékonynak, ha ezen körülmények között begyűjtött két minta közötti zsírtartalom különbsége kevesebb, mint 0,1%.

Olyan nagy méretű edényben, amelynek alsó kivezető nyílása van, a kimeneti pontnál lehetséges, hogy egy kis mennyiségű tej gyűlik össze, amely még a keverés után sem reprezentatív a teljes tartalomra nézve. Ezért a mintát lehetőség szerint vizsgálónyíláson keresztül érdemes levenni. Amennyiben a mintát a kivezető nyíláson keresztül vesszük le, engedjük ki megfelelő mennyiségű tejet ahhoz, hogy a minták a teljes állományra nézve legyenek reprezentatívak.

4.2.5.2. Nagy méretű edények vagy tárolók, vasúti vagy közúti tartályok tartalmának keverése történhet

- a tartályba épített és villanymotorral üzemeltetett mechanikai keverővel,
- a vizsgálónyílásra helyezett, villanymotorral hajtott csavarral vagy vibrációs keverővel, ahol a keverőt függesztve a tejbe engedik leérni,
- vasúti vagy közúti tartályok esetén a tejnek a tartály tank ürítő szivattyújához csatlakoztatott, és a vizsgálónyíláson behelyezett továbbító csövön keresztül történő keringetésével,
- tiszta, szűrt sűrített levegővel, ebben az esetben minimális nyomású és mennyiségű levegőt szabad alkalmazni azért, hogy az avas íz kialakulását elkerüljük.

4.3. Automata vagy félautomata mintavétel

A termelők szállítmányaiból történő nyers tej mintavételéhez automata vagy félautomata mintavételi eszközöket a mérést végző laboratóriumok vagy az illetékes hatóságok által adott utasításoknak megfelelően lehet alkalmazni.

Az ilyen berendezéseket a használatbavétel előtt és a használat során rendszeres időközönként az illetékes hatóság által előírt teszteken kell ellenőrizni. A mintavételi eljárások megfelelőségét a következők megállapítása céljából verifikálni kell:

- a gyűjtött minimális tej mennyiséget, amelyet megfelelőképpen lehet mintavételezni,
- bármilyen maradvány hányadot (amelyet a legkisebb minta térfogatához viszonyítunk),
- arra való alkalmasságot, hogy megfelelő keverés után a készletből reprezentatív minta legyen begyűjtendő.

Az automata vagy félautomata mintavételi berendezés használatakor az illetékes kompetens nemzeti hatóság előírhatja:

- a tej minimális mennyiségét, amelyből mintát ki szabad venni,
- a minta minimális mennyiségét,
- a maradék maximumát,
- milyen elemzést lehet elvégezni vagy milyen óvintézkedéseket kell megtenni.

4.4. Mintavétel a hőkezelt, közvetlen fogyasztásra szánt kiskereskedelmi kiszerelésű tejből

A hőkezelt, közvetlen fogyasztásra szánt kiskereskedelmi kiszerelésű tejmintákat a teljesen lezárt csomagolásból kell venni. Ha lehetőség van rá, a feldolgozás után minél rövidebb időn belül mintát kell venni a csomagológépből vagy az előállító hűtőteréből; a pasztörözött tej esetében a feldolgozás napján.

A mintákat mindegyik típusú hőkezelt tejből be kell gyűjteni (pasztörözött, UHT-kezelt és sterilizált), mégpedig olyan számban, amely megfelel az elvégzendő vizsgálatok számának és összhangban van a vizsgáló laboratórium vagy egyéb illetékes hatóság által meghatározott utasításoknak.

5. A minták azonosítása

A mintát azonosító kóddal kell ellátni úgy, hogy az pontosan azonosítható legyen és feleljen meg a vizsgálólaboratórium vagy az illetékes hatóság előírásainak.

6. A minták szállítása és tárolása

A szállításra, a tárolásra vonatkozó előírásokat, továbbá a mintavétel és a vizsgálat közötti megengedhető időtartamot a vizsgálólaboratórium adja meg a tej típusától és a vizsgálati módszertől, illetve a vonatkozó hatósági előírásoktól függően.

Az előírás a következőre térjen ki:

- a szállítás és tárolás során óvintézkedéseket kell alkalmazni, hogy megelőzzük a szennyező szagoknak és a közvetlen napfénynek való kitétel. Ha a mintákhoz használt tartály átlátszó, azt sötét helyiségben kell tárolni,
- a mikrobiológiai elemzés céljából begyűjtött nyers tej mintákat 0 °C és 4 °C között kell szállítani és tárolni. A mintavétel és az elemzés között eltelt idő a lehető legrövidebb kell, hogy legyen, és semmilyen körülmények között sem haladhatja meg a 36 órát. Az illetékes hatóság 0 °C és 6 °C közötti tárolási hőmérsékletet is elfogadhat, amennyiben a mintavétel és az elemzés között eltelt idő nem haladja meg a 24 órát,
- a mikrobiológiai elemzés céljából begyűjtött pasztörözött tej mintákat 0 °C és 4 °C között kell szállítani és tárolni. A mintavétel és az elemzés között eltelt idő a lehető legrövidebb kell, hogy legyen, és semmilyen körülmények között sem haladhatja meg a 24 órát,
- a mikrobiológiai elemzés céljából begyűjtött egyéb-, mint nyers és pasztörözött tej mintákat laboratóriumban hűtve kell tárolni és a mintavétel valamint az elemzés között eltelt idő a lehető legrövidebb kell legyen.

A különböző eljárásoknál az elemzésekre vonatkozó néhány speciális óvintézkedés kerül megadásra.

II. MELLÉKLET

- I. A FAGYÁSPONT MEGHATÁROZÁSA**
- II. A FOSZFATÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA**
- III. A PEROXIDÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA**
- IV. A MIKROBASZÁM MEGHATÁROZÁSA - ÖSSZCSÍRA SZÁM 30 °C-ON**
- V. A MIKROBASZÁM MEGHATÁROZÁSA - ÖSSZCSÍRA SZÁM 21 °C-ON**
- VI. A KOLIFORM SZÁM MEGHATÁROZÁSA - TELEPSZÁM 30 °C-ON**
- VII. A SZOMATIKUS SEJTEK MEGHATÁROZÁSA**
- VIII. ANTIBIOTIKUMOK ÉS SZULFONAMIDOK KIMUTATÁSA**
- IX. A PATOGÉN MIKROBÁK SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA**

I. A FAGYÁSPONT MEGHATÁROZÁSA

1. Alkalmazási lehetőség és terület

Ezen eljárás meghatározza a nyers, a pasztörözött, az UHT-kezelt és a sterilizett teljes tej, félzsíros tej és zsírszegény tej fagyáspontjának meghatározására vonatkozó referencia eljárást, amikor olyan eszközt (termisztor krioszkópot) használnak, amelynél egy hőszabályzott fürdőt elektromos hűtővel hűtik és a higanyos hőmérő helyett termisztor hőérzékelőt alkalmaznak.

Kétféle berendezés létezik. Az első a fagyási görbe „platóján” található maximum fagyáspontot méri, míg a második, gazdaságossági szempontok miatt a fagyás megkezdődése utáni megszabott időpontban mért hőmérsékletet adja meg fagyáspontként. Mivel a fagyáspont görbék tej fajtánként és magában a tejben is változhatnak valamint a kalibrációnál használt standard oldatok között is lehet eltérés, ez a referencia eljárás a fagyáspontgörbe maximumának meghatározására alkalmas berendezés alkalmazását írja elő. A rögzített időpontú mérőeszközöket a válogató méréseknél lehet rutin eljárás alkalmával használni.

A fagyáspont alapján becsülhető meg a tej idegen víz tartalma, amennyiben a minta savassága nem lépi túl a 0,18 g tejsav/100 ml-t (lásd 7.4).

2. Definíció

A tej fagyáspontja: Az eljárás szerint végzett mérés során kapott érték fok Celsiusban (°C) kerül megadásra.

3. Elv

Vizsgálandó mennyiségű tejet szuper-hűtéssel a berendezéstől függően megfelelő hőmérsékletre hűtenek le, és mechanikai vibrációval kristályosodást idéznek elő, emiatt a hőmérséklet gyorsan a platóig emelkedik, amely megfelel a minta fagyáspontjának.

A berendezés úgy van kalibrálva, hogy ugyanazzal az eljárással, mint amit a tejmintáknál használtak, helyes értéket adjon két standard oldatra. Ezen feltételek között a plató adja meg a tej fagyáspontját fok Celsiusban mérve.

4. Berendezések és üvegeszközök

Közönséges laboratóriumi berendezések és különösképpen:

4.1. Krioszkóp

A krioszkóp hőszabályzott hűtőfürdőből, termisztor hőmérséklet érzékelőből (félvezető ellenállás hőmérő), hozzá csatlakozó áramkörből és galvanométerből vagy „kijelzőből”, minta keverőből áll és egy olyan eszközből, amely a mintatartókkal együtt elindítja a fagyást.

4.1.1. Hűtő fürdő

Kétféle hűtőfürdőt lehet alkalmazni.

4.1.1.1. Immerziós típus

Megfelelő hűtőfolyadékot tartalmazó jól szigetelt fürdő, amely kevertetve van úgy, hogy a folyadék bármely két pontja közötti hőmérséklet különbség ne haladja meg a 0,2 °C-ot. A folyadék hőmérséklete nem ingadozhat több, mint $\pm 0,5$ °C-kal a gyártó által megadott névleges értékhez képest.

Fontos, hogy a hűtőfürdőben található folyadék állandó szinten maradjon. A térfogatjel alatt a küvetta teljes felszínét el kell, hogy lepje a hűtőfolyadék.

4.1.1.2. Cirkulációs típus

A küvetta körül folyamatosan a célnak megfelelő hűtőfolyadékot cirkuláltatnak. A folyadék hőmérséklete legfeljebb $\pm 0,5$ °C-kal térhet el a gyártó által megállapított névleges értéktől.

A célnak megfelelő hűtőfolyadék 33% (v/v)-os vizes etán-1,2 diol (etilén glikol) oldat.

4.1.2. Termisztor és a hozzá kapcsolódó áramkör

A termisztor üveg-hőérzékelő típusú kell legyen, amelynek átmérője nem haladhatja meg az $1,80 \pm 0,2$ mm-t és belső átmérője nem lehet több, mint 0,31 mm. A termisztor idő állandója nem lehet kevesebb, mint két másodperc valamint a v értéknek (lásd megjegyzés) magasnak kell lennie. Az üzem közbeni feszültségnek, áramnak és disszipációs állandónak akkorának kell lennie, hogy a termisztor hőmérséklete legfeljebb 0,0005 °C-kal emelkedjen -0,512 °C-on a környezet hőmérséklete fölé. A maximális ellenállási tolerancia $\pm 5\%$ kell, hogy legyen.

Amikor a hőérzékelő a krioszkópban mérőállásban van, az üveggömb alsó pontjának a küvetta tengelyében kell elhelyezkedni, $44,6 \pm 0,1$ mm-rel a henger tetejétől. A felhasznált sablonrajzzal kell ellátni, hogy a hőérzékelőt a megfelelő helyzetbe tudja beállítani.

Megjegyzés

β az egyenletnek megfelelően definiálja a termisztor ellenállás-hőmérsékleti karakterisztikáját:

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

ahol:

T a hőmérséklet Kelvinben kifejezve,

R az ellenállás Ohmban kifejezve T hőmérsékleten,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \alpha \text{ hőmérsékleti együttható,}$$

β = a termisztor anyagától függő állandó. A jelenlegi gyakorlatnak megfelelően 3 000 feletti érték javasolt.

4.1.3. Mérő és kijelző egység

4.1.3.1. A mérés elve

A használt eszköz működése a fagyáspont görbén található első plató megkeresésének elvén alapul. A plató a görbe azon része, amelynél a hőmérséklet $\pm 0,002$ °C-on belül legalább 20 másodpercig állandó marad.

4.1.3.2. Kézi működtetés

A termisztor ellenállását Wheatstone-híddal vagy ehhez hasonló eszköz segítségével kell kiegyenlíteni, amely $\pm 10\%$ -nál nem magasabb toleranciájú, a legjobb minőségű állandó ellenállásokból áll és hőmérsékleti együtthatója nem haladja meg a 2×10^{-5} °C-ot.

A változtatható (kiegyenlítő) ellenállás a teljes skála linearitásától legfeljebb a maximális érték 0,3%-ával térhet el.

Kalibrációs okból az ellenállásoknak valamilyen módon szabályozhatóknak kell lenniük.

A mérőtárcsát legalább 0,001 °C-onként kell beosztani.

4.1.3.3. Automatikus működtetés

A kijelzőnek 0-tól -1 °C-ig osztott skálán legalább 0,001 °C-os felbontást kell lehetővé tennie.

A kijelzőnek és a hozzá kapcsolódó áramkörnek olyannak kell lennie, hogy ugyanazon hőmérséklet egymást követő kijelzése ne térjen el több mint 0,001 °C-kal egymástól.

Az áramkör linearitásának olyannak kell lennie, hogy az eszköz szakszerű működtetése során ne fordulhasson elő $\pm 0,001$ °C-nál nagyobb hiba a -0,400 °C-tól -0,600 °C-ig terjedő skála bármely pontján.

4.1.4. Keverő bot

Egy tejszálra közömbös, 1 és 1,5 mm közötti átmérőjű rudat használnak a minta megkeveréséhez.

A keverő bot amplitúdóját be kell állítani, és úgy kell függőlegesen felszerelni, hogy az alsó vége ne legyen lejjebb, mint a termisztor csúcsa. Ezen helyzettől való kb. 1,5 mm-es le- vagy felfelé történő eltérés megengedett.

A keverő bot oldalirányban a gyártó által megállapított megfelelő amplitúdóval (legfeljebb $\pm 1,5$ mm) vibrál, így biztosítja, hogy a teszt minta hőmérséklete a meghatározás során egységes maradjon. A normál keverő működés alatt a keverő bot soha nem csapódhat hozzá a termisztor hőérzékelőhöz vagy a küvetta falához.

4.1.5. A fagyást kiváltó berendezés

Bármilyen eszköz lehet, amely működésbe lépve azonnal a minta fagyását idézi elő, tehát a minta hőmérséklete a fagyáspont felé mozdul el. Erre a célra használható a keverő bot; úgy, hogy egy-két másodpercre a vibráció amplitúdóját annyival kell növelni, hogy a keverő bot nekicsapódjon a küvetta falának.

4.1.6. Küvetta

A küvetta (lásd 1. ábra) üvegből készül, $50,8 \pm 0,1$ mm hosszú, $16,0 \pm 0,1$ mm a külső átmérője, belső átmérője pedig $13,5 \pm 0,1$ mm. A fal vastagságának eltérése a henger teljes hosszán legfeljebb 0,1 mm lehet.

A hengereken 29,8 mm-rel a végük alatt (21 mm-rel a henger alsó részétől) térfogat jelölést kell alkalmazni, hogy így $2,5 \pm 0,1$ ml térfogatú mintának feleljen meg.

4.1.7. Elektromos áramellátás

Az áramellátást vagy a berendezésen belül vagy azon kívül stabilizálni kell, hogy az ingadozás ne haladja meg a névleges érték $\pm 1\%$ -át, amikor a bemenő áramellátás $\pm 6\%$ -kal ingadozik.

4.2. Analitikai mérleg

4.3. *Mérőlombik, „A” osztályú, 1000 ml térfogatú, egyjelű.*

4.4. *Szárítószekrény, jól szellőző, amely képes a hőmérsékletet 130 ± 1 °C-on tartani vagy szellőző elektromos kemence, amely a hőmérsékletet 300 ± 25 °C-on képes tartani.*

4.5. Exszikkátor

5. Reagensek

5.1. *Boroszilikát üvegen desztillált víz, amelyet forralást követően 20 ± 2 °C-ra hűtenek le, széndioxid elnyelető csővel ellátott edényben.*

5.2. *Analitikai reagens minőségű finomra őrölt nátrium-klorid, amelyet 300 ± 25 °C-on 5 óráig kemencében vagy 130 ± 1 °C-on legalább 24 óráig szárítószekrényben szárítunk, majd megfelelő exszikkátorban szobahőmérsékletűre hűtünk le.*

5.3. Standard oldatok elkészítése

Mérjük ki megfelelő mennyiségű (lásd 1. táblázat) száraz nátrium-kloridot (5.2) a mérőedénybe. Oldjuk fel desztillált vízben (5.1), töltsük át egy 1000 ml-es egyjelű mérőlombikba és a jelig töltsük fel vízzel 20 ± 2 °C-on.

Legfeljebb 250 ml térfogatú, jól bedugaszolt polietilén edényekben tároljuk maximum két hónapig kb. 5 °C-on.

1. táblázat**Nátrium-klorid oldatok fagyáspontja 20 °C-on**

NaCl g /l	°C
6,859	-0,408
7,818	-0,464
8,149	-0,483
8,314	-0,492
8,480	-0,502
8,646	-0,512
8,811	-0,521
8,977	-0,531
9,143	-0,541
10,155	-0,600

Mielőtt standard oldatot használunk, az üveget fordítsuk fejjel lefelé, és óvatosan, többször körkörös mozgassuk, hogy az alkotórészek alaposan összekeveredjenek. A standard oldatot soha nem szabad erősen felkeverni, mert levegő kerülhet bele.

A standard oldatból úgy kell mintát venni, hogy az oldatot tiszta, száraz főzőpohárba töltjük, tehát pipetta erre a célra nem használható.

Nem lehet olyan oldatot használni, ami kevesebb, mint egynegyed részig telt üvegből származik, és hacsak az oldatot nem kezelik gombaölő szerrel (például tiomerzál oldattal, 10g/l), az két hónapnál nem lehet régebbi.

6. A termisztor krioszkóp kalibrációja

A krioszkópot úgy kell beállítani, hogy a környező levegő hőmérséklete legfeljebb 1 °C-kal térjen el attól a hőmérséklettől, amelyben a kalibrációt végzik. A krioszkópot nem szabad napfény sugárzásának, huzatnak, vagy 26-27 °C-nál magasabb hőmérsékletnek kitenni.

Győződjünk meg róla, hogy a krioszkóp a gyártó előírásainak megfelelően jó üzemi állapotban van, és a kalibráció előtt legalább 12 óráig be volt kapcsolva. Ellenőrizzük a hőérzékelő helyzetét, a keverőbot vibrációs amplitúdóját és a hűtőfolyadék hőmérsékletét.

Válasszunk ki két standard oldatot (lásd 1. táblázat fent), amelyek leginkább megközelítik a tesztelésre váró tejminták fagyáspontjának várható értékét. A két oldat fagyáspontja közötti különbség lehetőleg ne haladja meg a -0,100 °C-ot.

(Néhány jelenleg forgalomban lévő krioszkóp típus esetén a termisztorhoz kapcsolódó áramkört úgy tervezték meg, hogy annak kompenzálása a fagyáspont egy bizonyos értékén történjen meg a berendezés mérési skáláján belül. Ezekben az esetekben a ilyen fagyáspontú standard oldatnak az egyik kalibrációs oldatként történő felhasználása a kalibrációs eljárást segíti, a gyártó pedig ezt az értéket feltünteti.)

Pipettával az egyik standard oldatból mérjünk be $2,5 \pm 0,1$ ml-t egy tiszta, száraz kémcsőbe és helyezzük be a krioszkópot.

Megjegyzés:

A kalibráció során alkalmazott küvettáknak ugyanolyan típusú üvegből kell készülniük és ugyanabban az időben ionmentesített vízzel kell azokat kimosni illetve előblíteni, mint amelyet a tejminták tesztelésekor használtak. A standard oldatok és a tejminták hőmérsékleteinek hasonlóknak kell lenniük.

A gyártó utasításainak megfelelően állítsuk be a kalibrációs szabályozókat, amíg a kriozskóp a standard oldat fagyáspontjával megegyező értéket nem ad. Ismételjük meg az eljárást a másik standard oldattal is, és folytassuk tovább a műveletet ilyen módon váltakozva, amíg az egyes oldatok egymást követő leolvasásai megadják az oldatok helyes fagyáspont értékét, anélkül, hogy a kalibrációs szabályozókat újra állítottuk volna. A kriozskóp ezután használatra készen áll és bármilyen korrekció alkalmazása nélkül közvetlenül jelzi a tejminta fagyáspontját.

7. A vizsgálati minta előkészítése

7.1. Ha szükséges, 0 és 5 °C közötti hőmérsékleten tároljuk a mintákat.

7.2. A mintából távolítsunk el minden látható idegen testet vagy megszilárdult vajzsírt, szükség esetén szűrjük le a mintát egy tiszta, száraz edénybe és óvatosan keverjük össze. Ha szűrőt használunk, annak a tejre közömbösnek kell lennie, és laboratóriumi hőmérsékleten hatékonyan kell működnie.

7.3. A tejet akkor lehet vizsgálni, amikor az tárolási hőmérsékleten (0 és 5 °C között) van, vagy közvetlenül a mérés megkezdése előtt elérheti a laboratóriumi hőmérsékletet. Azonban fontos, hogy a standard oldatok és tejminták használatkor ugyanolyan hőmérsékletűek legyenek.

7.4. A lehető legpontosabban határozzuk meg a tej titrálható savasságát a fagyáspont vizsgálattal egy időben. A 0,18 g tejsav/100 ml savasság feletti minták nem vizsgálhatók.

7.5. Az UHT-kezelt és a sterilizett tejnek a vizsgálat megkezdése előtt legalább 20 percig nyitott tartályban kell állnia.

8. Eljárás

8.1. Előzetes ellenőrzések

Ellenőrizzük, hogy a hűtőfolyadék szintje és hőmérséklete megfelel a gyártó utasításainak, valamint amennyiben szükséges, ellenőrizzük, hogy a termisztor hőérzékelő üres mintacsőben helyezkedik el a mintatartón belül. Kapcsoljuk be a kriozskópot és győződjünk meg afelől, hogy a hűtőfolyadék berendezéstől függően megfelelően keveredik, illetve cirkulál. Amikor már a kriozskóp legalább 12 óráig be volt kapcsolva, ellenőrizzük a hűtőfolyadék hőmérsékletét és a keverőbot helyzetét, illetve vibrációs amplitúdóját.

8.2. Rutin kalibrációs ellenőrzés

A tesztek elvégzése előtt addig mérjük egy standard nátrium-klorid oldat fagyáspontját (pl. -0,512 °C-os fagyásponttal rendelkező oldat), amíg két egymást követő mérés közötti különbség nem haladja meg, a 0,001 °C-t. Ha ezen értékek átlaga a standard oldat fagyáspontjától több, mint 0,002 °C-kal tér el, a 6. pontban leírtaknak megfelelően a kriozskópot újra kell kalibrálni.

Amennyiben a kriozskópot folyamatosan használjuk, óránként legalább egyszer végezzük el a rutin kalibrációs ellenőrzést. A gyártó utasításait figyelembe kell venni.

8.3. A tej fagyáspontjának meghatározása

Óvatosan fordítsuk fejjel lefelé, majd többször körkörösén mozgassuk a mintatejes üveget, hogy a tartalma összekeveredjen. Soha ne keverjük meg a mintát olyan erősen, hogy levegőt juttassunk bele.

Pipettával mérjük a tejből $2,5 \pm 0,1$ ml-t egy tiszta, száraz küvettába és a pipettával távolítsuk el az esetleges felesleget. Győződjünk meg arról, hogy a hőérzékelő, illetve a keverőbot tiszta és száraz, amennyiben szükséges, azokat tiszta, száraz, szőszmentes puha kendővel alulról felfelé irányuló mozdulattal töröljük meg.

A gyártó utasításainak megfelelően helyezzük a küvettát a kalibrált krioszópba. A tej lehül, majd a gyártó által meghatározott hőmérsékleten $0,1$ °C-on belül megkezdődik a fagyás.

(Néhány automata berendezés esetén ez a hőmérséklet leolvasható a digitális kijelzőn; kézi berendezéseknél a szükséges pontosságot úgy biztosítjuk, hogy a fagyás akkor kezdődjön, amikor a galvanométer mutatója vagy a hajszálvonal egybeesik a megfelelő jelöléssel.)

Amennyiben bármilyen okból kifolyólag a fagyás a megadott hőmérsékleti tartomány elérése előtt vagy után kezdődik el, szakítsuk meg a mérést és ismételjük azt meg egy másik adag tejjel. Amennyiben az ismételt minta úgyszintén a megadott hőmérséklet elérése előtt fagy meg, a következő minta adagot melegítsük fel 45 °C-ra és tartsuk ott öt percig, hogy a kristályos tejszír megolvadhasson.

Ezután újra hűtsük le a mérési hőmérsékletig, és azonnal kezdjük el a mérést. A fagyás iniciálása után a tej hőmérséklete gyorsan fog emelkedni addig az értékig, amelynél egy bizonyos ideig gyakorlatilag állandó marad, majd újra csökkenni kezd. A fagyáspont megegyezik ezen időperiódus alatt elért legmagasabb hőmérséklettel, és ezt az értéket fel kell jegyezni.

Megjegyzés:

Az az időtartam, ami alatt a hőmérséklet állandó marad, valamint a fagyás iniciálása, illetve a legmagasabb hőmérséklet elérése közötti időintervallum mintánként más és más lehet, jelentős mértékben rövidebb víz és standard nátrium-klorid oldatok esetében, mint a tejnél. Fontos, hogy a legmagasabb hőmérséklet legyen az, ami feljegyzésre kerül.

Amikor a mérés sikeresen befejeződött, távolítsuk el a mintacsövet, öblítsük ki vízzel, majd töröljük szárazra a termisztor hőérzékelőt tiszta, szőszmentes puha kendővel, alulról felfelé irányuló mozdulattal, és végezzünk párhuzamos meghatározást egy másik adag tejmintával.

Amennyiben a kapott fagyáspontok közötti különbség meghaladja az ismételhetőségi értéket ($0,004$ °C), végezzünk párhuzamos meghatározást egy másik minta adagon. Ha a két meghatározás eredménye $0,004$ °C-on belüli egyezést mutat, az értékeket fel kell jegyezni és a végső eredmény kiszámításához fel kell használni.

8.4. A hőérzékelő lehűtése

A berendezés használatának befejezése után helyezzünk egy üres küvettát a mintatartóba és engedjük le a működtető fejet, hogy a hőérzékelőt hidegen tartsuk.

(Bizonyos krioszóp típusoknál ez nem lehetséges; ezekben az esetekben fontos, hogy a mérések elvégzése előtt biztosítsuk a hőérzékelő megfelelő hűtését, például úgy, hogy próba meghatározásokat végzünk egészen addig, amíg konzisztens eredményeket kapunk.)

9. Az eredmények megadása

9.1. Számítás

Amennyiben a rutin kalibrációs ellenőrzést követően a kalibráció helyesnek bizonyul, számítsuk ki a kapott elfogadható párhuzamos fagyáspont értékek átlagát, és kerekítsük azt három tizedesre.

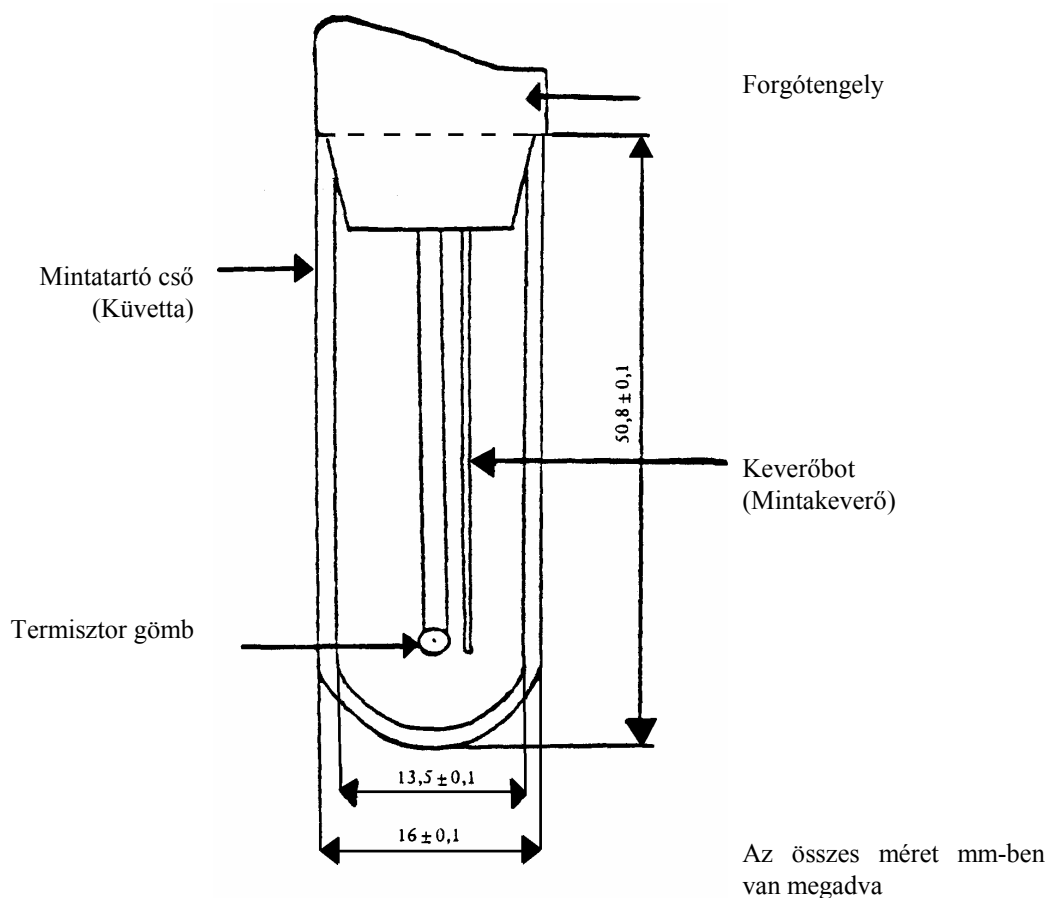
Ha két elfogadható párhuzamos eredmény összege páratlan szám, az átlag a következő példának megfelelően a legközelebbi páros számra kerekítendő:

Fagyáspont (°C)		
Párhuzamos eredmény		Átlag
-0,544	-0,545	-0,544
-0,545	-0,546	-0,546

9.2. Pontosság

9.2.1. Ismételtesség (r): 0,004 °C.

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



Termisztor krioszóp (4.1.) vázrajza (termisztor gömbbel és mintakeverővel helyes állásban)

II. A FOSZFATÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás meghatározza a referencia eljárást a pasztörözött tej foszfatáz aktivitásának meghatározásához.

2. Definíció

2.1. *A foszfatáz aktivitás az aktív alkalikus foszfatáz mennyiségének mértéke a termékben, mikrogrammban a fenol mennyiségeként kerül kifejezésre, amely a pasztörözött tej 1 ml-ére vonatkozó eljárásban említett körülmények között szabadul fel.*

2.2. *Bármilyen 4 µg/ml-nél kisebb foszfatáz aktivitású tej foszfatáz negatívnak tekintendő.*

3. Elv

A foszfatáz aktivitás a mintához adott dinátrium fenil-foszfatból felszabadult fenol mennyiségből kerül meghatározásra. A felszabaduló fenol dibrom-kinon-klórímiddel lép reakcióba, így (kékes színű) dibrom-indofenol keletkezik, amelyet kolorimetriás vizsgálattal 610 nm-nél mérnek. Összehasonlítják a mintával, ahol a foszfatáz enzim inaktíválva lett.

4. Reagensek

4.1. Bárium borát-hidroxid puffer

4.1.1. Vízben oldjunk fel 50,0 g bárium hidroxidot [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] és töltsük fel 1000 ml-re.

4.1.2. Vízben oldjunk fel 22,0 g bórsavat [H_3BO_3] és engedjük fel 1000 ml-re.

4.1.3. Az oldatokból 500 ml-t melegítsünk fel 50 °C-ra, vegyítsük el, keverjük, majd gyorsan hűtsük le az oldatokat kb. 20 °C-ra, ha szükséges állítsuk be a pH értéket $10,6 \pm 0,1$ -re a 4.1.1 vagy 4.1.2 hozzáadásával. Szűrjük meg. Az oldatokat jól bedugaszolt edényben tároljuk.

4.1.4. Felhasználás előtt az oldatot azonos mennyiségű vízzel hígítsuk.

4.2. Szín előhívó puffer

Vízben hígítsunk 6,0 g nátrium metaborátot (NaBO_2) vagy 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)-t és 20,0 g nátrium-kloridot (NaCl) és töltsük fel 1000 ml-re.

4.3. Szín hígítási puffer

Vízzel hígítsunk 10 ml szín előhívó puffert (4.2) 100 ml-re.

4.4. Puffer szubsztrát

Oldjunk 0,1 g fenol-mentes dinátrium fenilfoszfát dehidrátot 100 ml pufferben (4.1.3) vagy oldjunk 0,5 g dinátrium fenilfoszfátot 4,5 ml szín előhívó pufferben (4.2), adjunk hozzá két csepp BQC oldatot (4.6) és 30 percig hagyjuk szobahőmérsékleten állni. Extraháljuk ki az így kialakult színt 2,5 ml n-butanollal és hagyjuk állni, míg a butanol el nem különül. Válasszuk el és öntsük ki ezt a frakciót. Amennyiben szükséges, ismételjük meg az extrakciót.

Az oldat néhány napig hűtőszekrényben eltartható; használat előtt képezzük a színyanyagot, majd újra extraháljuk ki. A puffer szubsztrátot közvetlenül felhasználás előtt készítsük el ezen oldat 1 ml-ének bárium borát-hidroxid pufferrel 100 ml-re történő hígításával. (4.1.3).

4.5. Cink-réz kicsapószer

Oldjunk fel 3,0 g cink-szulfátot ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) és 0,6 g réz(II)szulfátot ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) vízben és hígítsuk fel 100 ml-re.

4.6. 2,6-dibróm-kinon-klórimid oldat (BQC-oldat)

Oldjunk fel 40 ± 1 mg 2,6-dibróm-kinon-klórimidet (BQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) 10 ml 96% (v/v) etanolban. Tároljuk sötét színű üvegben, hűtőszekrényben. Ha elszíneződött, vagy már egy hónapnál régebbi, öntsük ki.

4.7. Réz(II)szulfát oldat

Oldjunk fel 0,05 g réz(II)szulfátot ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) vízben, hígítsuk fel 100 ml-re.

4.8. Fenol standard oldatok

4.8.1. Mérjünk 200 ± 2 mg tiszta vízmentes fenolt, helyezzük át egy 100 ml-es mérőlombikba, adjunk hozzá vizet, vegyítsük el, és engedjük fel a jelig. Ez a törzsoldat hűtőszekrényben tárolva több hónapig stabil marad.

4.8.2. Vízrel hígítsunk fel 10 ml-t a törzsoldatból 100 ml-re és vegyítsük el. 1 ml 200 μg fenolt tartalmaz.

5. Berendezés és üvegeszközök

Megjegyzések:

- (a) Minden üveget, dugót és mintavevő eszközt alaposan meg kell tisztítani. Javasolt, hogy frissen forralt desztillált vízzel öblítsük el azokat, vagy helyezzük vízgőzbe.
- (b) Bizonyos műanyag dugók fenolos szennyeződést okozhatnak, így használatuk nem megengedett.

Szokványos laboratóriumi berendezések, különösképpen:

5.1. Analitikai mérleg

5.2. Vízfürdő, amely 37 ± 1 °C-ot képes tartani.

5.3. Spektrofotométer, amely 610 nm-es hullámhosszon alkalmas mérésre.

5.4. Kémcső, 16 vagy 18 mm \times 150 mm-es, előnyösen 5 és 10 ml-jellel.

5.5. Pipetták

5.6. Üveg tölcsér, megfelelő méretű, például 5 cm átmérőjű.

5.7. Szűrőpapír, redőzött, legalább 9 cm átmérőjű, közepes szűrési sebességű.

5.8. Mérőlombikok a standard oldatok elkészítéséhez.

6. Eljárás

Megjegyzések:

- (a) A meghatározás alatt kerülendő a közvetlen napfény.
- (b) Nyál- vagy izzadságnymok által okozott szennyeződés helytelen pozitív eredményt adhat, így ez elkerülendő. Ebből a szempontból a pipettázásra különleges gondot kell fordítani.

6.1. A minta előkészítése

6.1.1. Az elemzést közvetlenül a mintavétel után végezzük el. Egyéb esetben legfeljebb két napig tartuk a mintát hűtőszekrényben.

6.2. Minta adag

Pipettával 1 ml mintát mérjük a kémcsövekbe (5.4), egy kémcsövet használjunk kontroll vagy vakpróba célokra.

6.3. Meghatározás

6.3.1. Melegítsük a vakpróbát két percig forralt vízben; fedjük le a kémcsövet és a forralt vizet tartalmazó főzőpoharat alumínium fóliával, hogy biztosítsuk az egész kémcső melegedését. Gyorsan hűtsük le szobahőmérsékletre.

6.3.2. Hasonlóképpen járjunk el a vakpróba és a teszt minta esetén az eljárás többi részében. Adjunk hozzá 10 ml puffer szubsztrátot (4.4), majd vegyítsük el.

6.3.3. Azonnal helyezzük a mintákat vízfürdőbe (5.2), tartuk benne 60 percig, alkalmanként (legalább négyszer) keverjük össze a kémcsövek tartalmát.

6.3.4. A 6.3.1 pontban leírtaknak megfelelően hevítjük két percig forrásban lévő vízben. Gyorsan hűtsük le szobahőmérsékletre.

6.3.5. Adjunk 1 ml cink-réz kicsapószeret (4.5) a kémcsövekhez és alaposan keverjük össze a kémcsövek tartalmát.

6.3.6. Szűrjük át száraz szűrőpapíron, öntsük ki az első 2 ml-t, szükség esetén újra szűrjük át, addig, amíg a szűrlet teljesen tiszta nem lesz, ekkor 5 ml-t helyezzünk át kémcsőbe.

6.3.7. Adjunk hozzá 5 ml színelőhívó puffert. (4.2).

6.3.8. Adjunk hozzá 0,1 ml BQC oldatot (4.6), vegyítsük el és 30 percig szobahőmérsékleten hagyjuk, hogy a szín kialakuljon.

6.3.9. 610 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (5.3) a kontroll vagy a vakpróbával szemben mérjük meg az abszorbanciát.

6.3.10. Ismételjük meg a meghatározást a minta megfelelő hígításával, ha a 6.3.9 pontban leírtaknak megfelelően mért abszorbancia meghaladja a 6.4.4 pontban leírtaknak megfelelően mért, kémcsövenként 20 µg fenolt tartalmazó standard oldat abszorbanciáját. Ezt az oldatot a következőképpen készítjük el: vegyítsünk egy térfogatrész mintát ugyanannak a teszt mintának egy megfelelő térfogatával, amit gondosan forrásig hevítettünk a foszfatáz inaktiválása érdekében.

6.4. A kalibrációs görbe elkészítése

6.4.1. Készítsünk megfelelő tartományban hígított standard oldatokat, kezdjük a milliliterenként 0 (kontroll vagy vakpróba), 2, 5, 10 és 20 µg fenolt tartalmazó standard fenollal (4.8.2), és pipettával mérjük mind az öt kémcsőbe sorrendben 1 ml vizet és 1 ml-t a négy standard fenol oldatból.

6.4.2. Mindegyik kémcsőbe adjunk 1 ml réz(II)szulfát oldatot (4.7), 5 ml színhígító puffert (4.3), 3 ml vizet és 0,1 ml BQC oldatot (4.6); ezeket vegyítsük el.

6.4.3. 30 percig, szobahőmérsékleten hagyjuk, hogy a szín kifejlődjön.

6.4.4. 610 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (5.3) a kontroll vagy a vakpróbával szemben mérjük meg az abszorbanciát.

6.4.5. A hozzáadott fenol mennyiségekre (6.4.1) kapott abszorbancia értékekből (6.4.4) a legkisebb négyzetek módszerével számítsuk ki a regressziós egyenest.

7. Az eredmények megadása

7.1. Számítás és egyenlet

7.1.1. Számítsuk ki a fenol mennyiségét a kapott regressziós egyenes felhasználásával (6.4.5) az abszorbancia érték leolvasásából (6.3.9).

7.1.2. A következő egyenlettel számítsuk ki a foszfatáz aktivitást, amely a pasztörözött tej milliliterenkénti fenol tartalmának mikrogrammban való megadásával kerül kifejezésre:

$$\text{Foszfatáz aktivitás} = 2,4 \times A \times D$$

ahol:

A a 7.1.1 pontban meghatározottaknak megfelelően kapott fenol mennyiség mikrogrammban;

D a 6.3.10 pontban meghatározottaknak megfelelően elvégzett hígítás faktora (ha nem történt hígítás, $D = 1$);

A 2,4-es faktor a hígítási faktor (1 ml teszt minta 5/12 része) – A 6.3.2, 6.3.5 és 6.3.6 pontokkal kapcsolatban lásd 6.2 pontot.

7.2. Pontosság

7.2.1. Ismételhetőség (r): 2 μg fenol/ml.

7.2.2. Reprodukálhatóság (R): 3 (előzetes) μg fenol/ml.

7.2.3. Ha a 6.3.10 pontban foglaltaknak megfelelően hígítást alkalmaztak, a 7.2.1 és 7.2.2 pontokban említett határértékek a hígított mintára kapott eredményekre vonatkoznak.

III. A PEROXIDÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás referencia eljárásként meghatározza a tejben lévő peroxidáz enzim jelenlétének vagy hiányának kimutatását, mint a pasztörözöttség ellenőrzését.

2. Definíció

Peroxidáz-pozitív reakció:

Ha a tejet megfelelően pasztörözték, a keveredés után 30 másodpercen belül kék szín jelenik meg.

Peroxidáz-negatív reakció:

30 másodpercen belül nem jelenik meg szín.

3. Elv

A peroxidáz enzim hidrogén-peroxidot bont le. A felszabadult atomos oxigén a színtelen 1,4-fenilén-diamint bíborlila színű indofenollá oxidálja (Storch-próba). A szín intenzitása az enzim koncentrációjával arányos.

4. Reagensek

4.1. 1,4-fenilén-diamin oldat

Oldjunk fel 2 g 1,4-fenilén-diamint ($C_6H_8N_2$) meleg ($50\text{ }^\circ\text{C}$ -os) vízben és töltsük fel 100 ml-re. Az oldatot tartsuk sötétbarna, üvegdugóval ellátott üvegben, hűvös, száraz helyen. Az elkészítés után 1-2 napon belül az 1,4-fenilén-diamin oldatból üledék válik ki; ekkor ki kell önteni.

4.2. Hidrogén-peroxid oldat

Hígítsunk 9 ml 30%-os vizes hidrogén-peroxidot vízzel és töltsük fel 100 ml-re. Stabilizálás céljából adjunk az oldathoz literenként 1 ml koncentrált kénsavat.

A hidrogén-peroxid oldat egy hónapig stabil marad, ha hűvös, sötét helyen tároljuk és az üveget üvegdugóval zárjuk le, hogy megelőzzük a szerves vegyületekkel való érintkezést.

5. Eljárás

5.1. Tegyük 5 ml tej mintát egy megfelelően zárható tiszta kémcsőbe.

5.2. Adjunk hozzá 5 ml 1,4-fenilén-diamin oldatot (4.1).

5.3. Adjunk hozzá 2 csepp hidrogén-peroxid oldatot (4.2).

5.4. Figyeljük az összekeverés után 30 másodpercen belül kialakuló színt. Ha a kék szín a reagens hozzáadása után több, mint 30 másodperc után jelenik meg, a reakció nem specifikus.

IV. A MIKROORGANIZMUS-SZÁM MEGHATÁROZÁSA – ÖSSZCSÍRASZÁM $30\text{ }^\circ\text{C}$ -ON

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás meghatározza a referencia eljárást a mikrobaszám meghatározásra, telepszámlálási technika segítségével $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Az eljárás alkalmazható nyers és pasztörözött tejre, valamint a 15 napig $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on előinkubált UHT-kezelt és sterilizett tejre.

2. Definíció

A 'mikroorganizmus' kifejezés alatt értendő: azon organizmusok, amelyek megszámlálható telepeket alkotnak, areob módon inkubálva, a leírt feltételek mellett.

3. Elv

A tejminta meghatározott mennyiségét Petri-csészében összekeverik a táptalajjal és $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on 72 órán át inkubálják. A telepeket megszámlálják, és kiszámítják az 1 ml nyers vagy pasztörözött tejre vagy 0,1 ml előinkubált UHT-kezelt vagy sterilizett tejre vonatkoztatott mikroorganizmusok számát.

4. Berendezés és üvegeszközök

Szokványos laboratóriumi berendezések, és különösképpen:

4.1. Berendezések

4.1.1. Hőlégmentesítő, amely 170 és $175\text{ }^\circ\text{C}$ között képes működni.

4.1.2. Autokláv, amely $121 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ -on képes működni.

- 4.1.3. Inkubátor, amely képes bármely belső pontján a hőmérsékletet 30 ± 1 °C-on tartani.
- 4.1.4. Hőmérséklet kompenzációs pH-méter, amely $\pm 0,1$ pH egységig pontos mérést ad.
- 4.1.5. Vízfürdő, amely képes 45 ± 1 °C-on működni.
- 4.1.6. Nagyító, 2-4x nagyítású.
- 4.1.7. Nagyító, 8-10x nagyítású.
- 4.1.8. Telepszámláló berendezés.
- 4.1.9. Keverő, amely képes 1 ml tej minta vagy a decimális hígítások (1 + 9 ml) keverésére és működési elve a kémcső tartalmának excentrikus rotációja.

4.2. Üvegeszközök

- 4.2.1. Kémcsövek, megfelelően zárhatóak és elegendő térfogatúak, amelyek megfelelő hosszúságúak a 10 ml alaphígítás vagy a további decimális hígítások keveréséhez.
- 4.2.2. Lombikok, 150-től 250 ml-es térfogatúak, vagy kémcsövek, kb. 20 ml térfogatúak, a táptalaj tárolásához.
- 4.2.3. Pipetták (vattával bedugaszolt) üvegből vagy steril szintetikus anyagból készültek, amelyeknek csúcsa ép, névleges térfogata 1 ml, és kifolyó nyílásának átmérője 1,75-től 3 mm.
- 4.2.4. Petri-csészék, tiszta, szintelen üvegből vagy steril szintetikus anyagból. Az alsó csésze belső átmérője kb. 90-100 mm. A belső mélység legalább 10 mm. Az alsó részen nem lehetnek rendellenességek, amelyek a telepszámlálást befolyásolhatják.
- 4.2.5. Üvegeszközök sterilizése

Az üvegeszközöket a következő eljárások egyikének alkalmazásával kell sterilizni:

- (a) hőlégenderizelőben legalább 1 óráig 170 és 175 °C között tartani (4.1.1);
- (b) autoklávban legalább 20 percig 121 ± 1 °C-on tartani (4.1.2).

Figyelni kell arra, hogy az autoklávban biztosítsuk a megfelelő gőzáthatolást – pl. ha az eszközöket tároló edényben sterilizzük, azt ne zárjuk le szorosan, valamint a lombikokra is lazán helyezük rá a tetőt.

Az autoklávban sterilizett üvegeszközöket gőz kiengedésével kell szárítani.

A pipettákat hőlégenderizelőben kell sterilizni.(4.1.1).

5. Táptalaj – tejpóros tápagar összcsíraszám meghatározáshoz

5.1. Összetétel:

Élesztő kivonat	2,5 g
Tripton	5,0 g
Glükóz D (+) vagy Dextróz	1,0 g
Sovány tejpor	1,0 g
Agar	10-15 g, a használt agar gélképző tulajdonságaitól függően.
Víz	1000 ml

A sovány tejpornak gátlóanyagoktól mentesnek kell lennie. Ezt összehasonlító vizsgálatokkal kell igazolni, ahol ismertén gátlóanyagoktól mentes sovány tejporthoz alkalmazunk.

Elkészítés:

Az alkotórészeket a következő sorrendben szuszpendáljuk és oldjuk fel a vízben: élesztő kivonat, tripton, glükóz majd legvégül a sovány tejpor. A szuszpenzió felmelegítése elősegíti a folyamatot. Adjuk hozzá az agart és forrásig hevítjük fel, folytonosan kevergetve, amíg az agar teljesen fel nem oldódik, vagy gőzöljük 30 percig.

Amennyiben szükséges, szűrjük át szűrőpapíron.

pH mérővel (4.1.4) ellenőrizzük a pH-t, szükség esetén állítsuk be a pH-t, hogy a sterilizálás után az $6,9 \pm 0,1$ legyen 25 °C -on, nátrium-hidroxid vagy sósav oldat (legalább $0,1\text{ mol/l}$) felhasználásával.

5.2. A táptalaj dozírozása, sterilizálása és tárolása

Adagoljuk ki a táptalajt (5.1) 100-tól 150 ml-es mennyiségekben lombikokba vagy 12-től 15 ml-es mennyiségekben kémcsövekbe (4.2.2). Dugaszoljuk be a lombikokat és a kémcsöveket.

Sterilizáljuk autoklávban (4.1.2) $121 \pm 1\text{ °C}$ -on 15 percig.

Ellenőrizzük a közeg pH-ját.

Ha a táptalaj nem kerül azonnal felhasználásra, tároljuk sötét helyen, 1 és 5 °C közötti hőmérsékleten az elkészítés után legfeljebb egy hónapig.

5.3. Kereskedelmben készen kapható vízmentes táptalaj

A táptalajt (5.1) el lehet készíteni kereskedelmben készen kapható vízmentes táptalajból. Kövessük a gyártó utasításait, de ha a táptalaj nem tartalmaz sovány tejport alkotórészként, azt a feloldás előtt adjuk hozzá.

Az 5.1-ben leírtaknak megfelelően állítsuk be a pH-t $6,9 \pm 0,1$ -ra 25 °C -on, majd adagoljuk ki, sterilizáljuk és tároljuk a táptalajt az 5.2-ben leírtaknak megfelelően.

6. Hígítófolyadékok*6.1. Pepton/só oldat**Összetétel:*

Pepton	1,0 g
Nátrium-klorid (NaCl)	8,5 g
Víz	1000 ml

Elkészítés:

Az összetevőket oldjuk fel vízben, szükség esetén melegítjük.

pH mérővel (4.1.4) ellenőrizzük a pH-t, és ha szükséges, állítsuk be a pH-t, hogy sterilizálás után az $7,0 \pm 0,1$ legyen 25 °C -on, nátrium-hidroxid vagy sósav oldat (legalább $0,1\text{ mol/l}$) felhasználásával.

6.2. A hígítófolyadék elosztása, sterilizálása és tárolása

Adagoljuk ki a hígítófolyadékot (6.1) kémcsövekbe akkora mennyiségekben, hogy a sterilizálás után a kémcsövek egyenként $9,0 \pm 0,2\text{ ml}$ hígítófolyadékot tartalmazzanak. Zárjuk le a kémcsöveket.

Sterilezzük autoklávban (4.1.2) 121 ± 1 °C-on 15 percig.

Ellenőrizzük a hígítófolyadék pH-ját.

Ha a hígítófolyadék nem kerül azonnal felhasználásra, tároljuk sötét helyen, 1 és 5 °C közötti hőmérsékleten az elkészítés után legfeljebb egy hónapig.

6.3. Kereskedelemben készen kapható vízmentes hígítófolyadékok

A hígítófolyadékot (6.1) el lehet készíteni kereskedelemben készen kapható vízmentes tablettából vagy porból. Kövessük a gyártó utasításait. A 6.1 pontban foglaltaknak megfelelően állítsuk be a pH-t, mérjük szét, sterilezzük és tároljuk a 6.2-es pontnak megfelelően.

7. Eljárás

7.1. A táptalaj megolvasztása

A mikrobiológiai vizsgálat elkezdése előtt gyorsan olvasszuk fel a kívánt mennyiségű táptalajt és tartsuk vízfürdőben 45 ± 1 °C-on. (4.1.5).

7.2. A tejminta előkészítése

A tejmintát tartalmazó edény 25-szöri gyors ide-oda forgatásával alaposan keverjük össze a tejmintát, hogy a mikroorganizmusok eloszlása a lehető legegyszerűsebb legyen. A habosodást vagy a hab szétterjedését kerülni kell. A vizsgálati minta összekeverése és a vizsgálathoz szükséges mintamennyiség kivétele között eltelt idő ne legyen három percnél hosszabb.

7.3. Az alaphígítás elkészítése (10^{-1}) (nyers és pasztörözött tej)

1 ml nyers vagy pasztörözött tejmintát (7.2) steril pipettával (4.2.3) helyezünk át 9 ml hígítófolyadékba (6.1) úgy, hogy a pipetta ne érintkezzen a hígítófolyadékkal. A hígítófolyadék hőmérsékletének körülbelül azonosnak kell lenni a tejmintáéval. Óvatosan keverjük össze ezt az alaphígítást keverőben (4.1.9) 5-10 másodpercig.

Így a 10^{-1} hígítást kapjuk.

7.4. További decimális hígítások elkészítése (nyers és pasztörözött tej)

A 7.3 pontban leírtaknak megfelelően steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 1 ml-t az alaphígításból (7.3) 9 ml hígítófolyadékba (6.1).

Így a 10^{-2} hígítást kapjuk.

További decimális hígítások előállításához ismételjük ezeket a műveleteket egészen addig, amíg megkapjuk azt a hígítási fokot, amely a várható mikroorganizmus számnak megfelel. (8.1.1).

7.5. Petri-csészék beoltása (inokuláció)

7.5.1. Nyers tej: Steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 1 ml mintát és/vagy megfelelő decimális hígítású oldatot egy Petri-csészébe (4.2.4). Legalább kétféle hígítást kell vizsgálni. A megfelelően kiválasztott hígításokból készítsünk egy inokulált Petri-csészét (8.1.1).

7.5.2. Pasztörözött tej: Steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 1 ml mintát és/vagy megfelelő decimális hígítást egy Petri-csészébe (4.2.4). Legalább kétféle hígítást kell vizsgálni. A megfelelően kiválasztott hígításokból készítsünk két inokulált Petri-csészét (8.1.1).

7.5.3. UHT-kezelt és sterilizált tej (15 napig tartó 30 °C-on történő inkubáció után vizsgálva - Direktíva "A" Függelék, VII. fejezet, 5. pont):

Steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 0,1 ml tej mintát (7.2) egy Petri-csészébe (4.2.4). Készítsünk el két inokulált Petri-csészét.

7.6. Lemezöntés

Öntsünk kb. 15-18 ml táptalajt (7.1) mindegyik inokulált Petri-csészébe.

Közvetlenül az öntés után keverjük el az anyagot úgy, hogy a Petri-csészét körkörös mozgattuk, azért, hogy az inkubáció után egyenletes eloszlású telepeket kapjunk.

A tejminta előkészítésének befejezése és a tejféleségektől függő anyagmennyiségnek vagy a hígításának a táptalajjal való összekeverése között eltelt idő nem haladhatja meg a 15 percet.

Tiszta, hűvös, vízszintes felületen hagyjuk megszilárdulni.

7.7. Petri-csészék inkubációja

Helyezzük át a Petri-csészéket az inkubátorba (4.1.3). Inkubáljuk a megfordított Petri-csészéket. Ne rakjunk 6-nál több Petri-csészét egymás tetejére. A Petri-csésze halmok nem érintkezhetnek egymással vagy az inkubátor falával és tetejével.

Inkubáljuk őket 30 ± 1 °C-on 72 ± 2 órán át.

7.8. Telepszám meghatározása

A 300-nál kevesebb telepet tartalmazó Petri-csészékben (lemezeken) határozzuk meg a telepszámot.

A Petri-csészéket vizsgáljuk alsó megvilágításban. A szám meghatározás elősegítése érdekében a célnak megfelelő nagyító (4.1.6) és/vagy telepszámláló berendezés használható (4.1.8). A Petri-csészében kicsapódott anyagrészecskéket ne tévesszük össze a tüzúrásnyi telepekkel. Amennyiben szükséges, a kétséges képződményeket alaposan vizsgáljuk meg erősebb nagyítású nagyítóval (4.1.7), hogy meg tudjuk különböztetni a telepeket az idegen anyagoktól.

Az összefolyó telepek egyetlen telepnek számítanak. Ha a Petri-csésze egynegyed részénél kisebb területét töltik ki az összefolyó telepek, a Petri-csésze többi részén határozzuk meg a telepszámot, és számoljuk ki az ennek megfelelő számot a teljes Petri-csészére vonatkozólag. Ha a Petri-csésze egynegyed részénél nagyobb területen található meg a szétterülő telepek, a lemezt nem értékeljük.

8. Az eredmények kiszámítása és megadása

8.1. Nyers és pasztörözött tej

8.1.1. Minden 10 és 300 közötti telepszámú Petri-csészéből (lemezből) határozzunk meg telepszámot (lásd 8.1.3 és 8.1.4 pontokat).

8.1.2. A nyers vagy pasztörözött tej 1 ml-enkénti mikroorganizmus száma a következő formulával számítható ki:

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

ahol:

$$\sum C = 8.1.1 \text{ pont alapján meghatározott telepszám,}$$

$(n_1+0,1n_2)d$ = a mért minta térfogata, amelyben:

n_1 = az első hígításból figyelembe vett Petri-csészék (lemezek) száma,

n_2 = a második hígításból figyelembe vett Petri-csészék (lemezek) száma,

d = az első értékelte hígítás faktora.

Az eredményt két értékes számjegyre kerekítve adjuk meg. Amikor a kerekítendő számjegy öt, úgy kerekítsünk, hogy a közvetlenül balra eső szám páros legyen.

Példa (pasztörözött tej):

10^{-2} hígítás: 278 és 290 telep

10^{-3} hígítás: 33 és 28 telep

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

8.1.3. Ha csak 10-nél kisebb számot határoztunk meg, akkor a ml-enkénti mikroorganizmusok számát "kevesebb, mint $10 \times d/\text{ml}$ " szöveggel adjuk meg, ahol 'd' a legkisebb hígítási faktor reciprok értéke.

8.1.4. Ha csak 300-nál nagyobb telepszámot határoztunk meg, de a számolás lehetséges, határozzunk meg egy becsült számot, és szorozzuk meg a hígítási faktor reciprok értékével. Az eredményt "Becsült mikroorganizmus szám/ml" szöveggel adjuk meg.

8.2. UHT és sterilizett tej

Ha 0,1 ml mintában az összcsíraszám több, mint 10 telep, akkor már nem elégíti ki a 85/397/EGK irányelv követelményeit.

9. Pontosság

Nemzetközileg elfogadott összehasonlító vizsgálati eredmények még nem állnak rendelkezésre.

V. MIKROBASZÁM MEGHATÁROZÁSA – ÖSSZCSÍRASZÁM 21 °C-ON

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás a mikroorganizmus szám meghatározásának referencia eljárását adja meg pasztörözött tej esetében, telepszámlálással 21 °C-on, ahol először a tejet 6 °C-on 5 napig inkubálják annak érdekében, hogy meghatározzák a pasztörözött tejben a 6 °C-on szaporodni képes hidegtűrő mikroorganizmusokkal való szennyezettség mértékét.

2. Definíció

A 'mikroorganizmus' kifejezés alatt értendő: azon organizmusok, amelyek a leírt körülmények között aerob módon inkubálva, megszámlálható telepeket hoznak létre.

3. Elv

A pasztörözött tejet öt napig 6 °C-on inkubálják. A minta meghatározott mennyiségét Petri-csészében összekeverik a táptalajjal és 21 °C-on 25 órán át inkubálják.

A telepeket megszámlálják, és kiszámítják az 1 ml pasztörözött tejre vonatkoztatott mikroorganizmusok számát.

4. Berendezés és üvegeszközök

Szokványos laboratóriumi berendezések, és különösképpen:

4.1. Berendezések

4.1.1. Hőlégmenterizáló, amely 170 és 175 °C között képes működni.

4.1.2. Autokláv, amely 121 ± 1 °C-on képes működni.

4.1.3. Inkubátorok, amelyek képesek bármely belső ponton a hőmérsékletet

(a) $6 \pm 0,2$ °C-on,

(b) 21 ± 1 °C-on

tartani.

4.1.4. pH-mérő, hőmérséklet kompenzált, amely $\pm 0,1$ pH egységig pontos mérést ad.

4.1.5. Vízfürdő, amely képes 45 ± 1 °C-on működni.

4.1.6. Nagyító, 2-4x nagyítású.

4.1.7. Nagyító, 8-10x nagyítású.

4.1.8. Telepszámláló készülék.

4.1.9. Keverő, amely képes 1 ml tej minta vagy a decimális hígítások (1 + 9 ml) keverésére és működési elve a kémcső tartalmának excentrikus rotációja.

4.2. Üvegeszközök

Kémcsövek, megfelelően zárhatóak és elegendő térfogatúak, és megfelelő hosszúságúak a 10 ml alaphígítás vagy további decimális hígítások keveréséhez.

4.2.2. Lombikok, 150-250 ml-es térfogatúak, vagy kb. 20 ml térfogatú kémcsövek, a táptalaj tárolásához.

4.2.3. Pipetták, (vattával bedugaszolt) üvegből vagy steril szintetikus anyagból készült, ek ép csúcsú, 1 ml névleges térfogatú és kifolyó nyílásának átmérője 1,75-től 3 mm.

4.2.4. Petri-csészék, tiszta, szintelen üvegből vagy steril szintetikus anyagból készült, ahol az alsó Petri-csésze belső átmérője kb. 90-100 mm. A belső mélység legalább 10 mm. Az alsó részen nem lehetnek rendellenességek, amelyek a telepszámlálást befolyásolhatják.

4.2.5. Üvegeszközök sterilizése:

Az üvegeszközöket a következő eljárások egyikének alkalmazásával kell sterilizelni:

(a) hőlégmenterizálóban legalább 1 óráig 170 és 175 °C között tartani (4.1.1);

(b) autoklávban legalább 20 percig 121 ± 1 °C-on tartani (4.1.2).

Figyelni kell arra, hogy az autoklávban biztosítsuk a megfelelő gőzáthatolást – pl. ha a berendezést tárolóedényben sterilizzük, azt ne zárjuk le szorosan, valamint a lombikokra is lazán helyezzük rá a tetőt.

Az autoklávban sterilizett üvegeszközöket gőz kiengedésével kell szárítani.

A pipettákat hőlégmenterizációban kell sterilizálni.(4.1.1).

5. Táptalaj – tejpóros tápagar összcsíraszám meghatározáshoz

5.1. Összetétel:

Élesztő kivonat	2,5 g
Tripton	5,0 g
Glükóz D (+) vagy dextróz	1,0 g
Sovány tejpóros	1,0 g
Agar	10-15 g, a használt agar gélképző tulajdonságaitól függően.
Víz	1000 ml

A sovány tejpórosnak gátlóanyagoktól mentesnek kell lennie. Ezt összehasonlító vizsgálatokkal kell igazolni, ahol ismertén gátlóanyag mentes sovány tejpóros alkalmazunk.

Elkészítés:

Az alkotórészeket a következő sorrendben szuszpendáljuk és oldjuk fel a vízben: élesztő kivonat, tripton, glükóz majd legvégül a sovány tejpóros. A szuszpenzió felmelegítése elősegíti a folyamatot. Adjuk hozzá az agart és forrásig hevítjük fel, folytonosan keverjük, amíg az agar teljesen fel nem oldódik, vagy gőzöljük 30 percig.

Amennyiben szükséges, szűrjük át szűrőpapíron.

A pH mérővel (4.1.4) ellenőrizzük a pH-t, szükség esetén állítsuk be a pH-t, hogy a sterilizálás után az $6,9 \pm 0,1$ legyen 25 °C -on, nátrium-hidroxid vagy sósav oldat (legalább $0,1\text{ mol/l}$) felhasználásával.

5.2. A táptalaj elosztása, sterilizációja és tárolása

Adagoljuk ki a táptalajt (5.1) 100-tól 150 ml-es mennyiségekben lombikokba vagy 12-15 ml-es mennyiségekben kémcsövekbe (4.2.2). Dugaszoljuk be a lombikokat és a kémcsöveket.

Sterilizáljuk autoklávban (4.1.2) $121 \pm 1\text{ °C}$ -on 15 percig.

Ellenőrizzük a közeg pH-ját.

Ha a táptalaj nem kerül azonnal felhasználásra, tároljuk sötét helyen, 1 °C és 5 °C közötti hőmérsékleten az elkészítés után legfeljebb egy hónapig.

5.3. Kereskedelemben készen kapható vízmentes táptalaj

A táptalajt (5.1) el lehet készíteni kereskedelemben készen kapható vízmentes táptalajból. Kövessük a gyártó utasításait, de ha a táptalaj nem tartalmaz sovány tejpóros alkotórészként, azt a feloldás előtt adjuk hozzá.

Az 5.1-ben leírtaknak megfelelően állítsuk be a pH-t $6,9 \pm 0,1$ -re 25 °C -on, majd adagoljuk ki, sterilizzük és tároljuk a táptalajt az 5.2-ben leírtaknak megfelelően.

6. Hígítófolyadékok

6.1. Pepton/só oldat

Összetétel:

Pepton	1,0 g
Nátrium-klorid (NaCl)	8,5 g
Víz	1000 ml

Elkészítés:

Az összetevőket oldjuk fel vízben, szükség esetén melegítjük.

pH mérővel (4.1.4) ellenőrizzük a pH-t, és ha szükséges, állítsuk be a pH-t, hogy sterilizálás után az $7,0 \pm 0,1$ legyen 25 °C -on, nátrium-hidroxid vagy sósav oldat (legalább $0,1\text{ mol/l}$) felhasználásával

6.2. A hígítófolyadék elosztása, sterilizálása és tárolása

Adagoljuk ki a hígítófolyadékot (6.1) kémcsövekbe, olyan mennyiségekben, hogy a sterilizálás után a kémcsövek egyenként $9,0 \pm 0,2\text{ ml}$ hígítófolyadékot tartalmazzanak. Dugaszoljuk be a kémcsöveket.

Sterilezzük autoklávban (4.1.2) $121 \pm 1\text{ °C}$ -on 15 percig.

Ellenőrizzük a hígítófolyadék pH-ját.

Ha a hígítófolyadék nem kerül azonnal felhasználásra, tároljuk sötét helyen, 1 és 5 °C közötti hőmérsékleten az elkészítés után legfeljebb egy hónapig.

6.3. Kereskedelmben készen kapható vízmentes hígítófolyadékok

A hígítófolyadékot (6.1) el lehet készíteni kereskedelmben készen kapható vízmentes tablettából vagy porból. Kövessük a gyártó utasításait. A 6.1 pontban foglaltaknak megfelelően állítsuk be a pH-t, öntsük edénybe, sterilizzuk és tároljuk a 6.2-es pontnak megfelelően.

7. Eljárás

7.1. A táptalaj megolvasztása

A mikrobiológiai vizsgálat elkezdése előtt gyosan olvasszuk fel a kívánt mennyiségű táptalajt és vízfürdőben hűtsük le $45 \pm 1\text{ °C}$ -ra. (4.1.5).

7.2. A tejminta előkészítése

7.2.1 Bontatlan csomagolású pasztörözött tejet inkubáljunk, vagy ha ez nem lehetséges, akkor legalább 100 ml -nyi reprezentatív mintát, 120 ± 2 órán át $6 \pm 0,5\text{ °C}$ -on (4.1.3 (a)).

7.2.2 Az inkubáció után a tejmintát tartalmazó edény 25-ször történő gyors ide-oda forgatásával alaposan keverjük össze a tejmintát, hogy a mikroorganizmusok eloszlása a lehető legegyszerűsebb legyen. A habosodást vagy a hab szétterjedését kerülni kell. A vizsgálati minta összekeverése és a vizsgálathoz szükséges mennyiség kivétele között eltelt idő ne legyen három percnél hosszabb.

7.3. Az alaphígítás elkészítése (10^{-1})

1 ml tejmintát (7.2.2) steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 9 ml hígítófolyadékba (6.1) úgy, hogy a pipetta ne érintkezzen a hígítófolyadékkal. A hígítófolyadék hőmérsékletének körülbelül azonosnak kell lenni a tejmintáéval. Óvatosan keverjük össze ezt az alaphígítást keverőben (4.1.9) 5-10 másodpercig. Így megkapjuk a 10^{-1} -en fokú alaphígítást.

7.4. További decimális hígítások elkészítése

A 7.3. pontban leírtaknak megfelelően steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 1 ml alaphígítást (7.3) 9 ml hígítófolyadékba (6.1).

Így 10^{-2} hígítású mintát kapunk.

További decimális hígítású minták előállításához ismételjük ezeket a műveleteket egészen addig, amíg megkapjuk azt a hígítási fokot, amely a várható mikroorganizmus számnak megfelel. (8.1).

7.5. Petri-csészék beoltása (inokuláció)

7.5.1. Steril pipettával (4.2.3) vigyünk át 1 ml mintát és/vagy a megfelelő decimális hígítását egy Petri-csészébe (4.2.4). Legalább kétféle hígítást kell vizsgálni. A megfelelő hígításokból készítsünk két inokulált Petri-csészét. (8.1).

7.6. Lemezöntés

Öntsünk kb. 15-18 ml táptalajt (7.1) mindegyik beoltott Petri-csészébe.

Közvetlenül az öntés után keverjük el az anyagot úgy, hogy a Petri-csészét körkörös mozgattuk, annak érdekében, hogy az inkubáció után egyenletes eloszlású telepeket kapjunk.

A tejminta előkészítésének befejezése és a hígításoknak a táptalajjal való összekeverése között eltelt idő nem haladhatja meg a 15 percet.

Tiszta, hűvös vízszintes felületen hagyjuk megszilárdulni.

7.7. Petri-csészék inkubációja

Helyezzük át a Petri-csészéket az inkubátorba (4.1.3 (b)). Inkubáljuk a megfordított Petri-csészéket. Ne rakjunk 6-nál több Petri-csészét egymás tetejére. A Petri-csésze halmok nem érintkezhetnek egymással vagy az inkubátor falával és tetejével.

Inkubáljuk őket 21 ± 1 °C-on 25 órán át.

7.8. Telepszám meghatározása

A 300-nál kevesebb telepet tartalmazó Petri-csészékben határozzuk meg a telepszámot.

A Petri-csészéket vizsgáljuk alsó megvilágításban. A szám meghatározás megkönnyítése érdekében a célnak megfelelő nagyító (4.1.6) és/vagy telepszámláló berendezés használható. (4.1.8). A Petri-csészékben kicsapódott anyagrészecskéket ne tévesszük össze a túsűrűségi telepekkel. Amennyiben szükséges, a kétséges képződményeket alaposan vizsgáljuk meg erősebb nagyítású nagyítóval (4.1.7), hogy meg tudjuk különböztetni a telepeket az idegen anyagoktól.

Az összefolyó telepek egyetlen telepnek számítanak. Ha a Petri-csésze egynegyed részénél kisebb területét töltik ki összefolyó telepek, a Petri-csésze többi részén határozzuk meg a telepszámot, és számoljuk ki az ennek megfelelő számot a teljes Petri-csészére vonatkozólag. Ha a Petri-csésze egynegyed részénél nagyobb területen található meg az összefolyó telepek, a lemezt (Petri-csészét) nem értékeljük.

8. Az eredmények kiszámítása és megadása

8.1. Minden 10 és 300 közötti telepszámot tartalmazó Petri-csészéből (lemezről) határozzuk meg a telepszámot (lásd 8.3 és 8.4).

8.2. A pasztörözött tej 1 ml-enkénti mikroorganizmus száma a következő formulával számítható ki:

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

ahol:

$$\sum C = 8.1 \text{ pont alapján meghatározott telepszám,}$$

$(n_1+0,1n_2)d$ = a mért minta térfogata, amelyben:

n_1 = az első hígításból figyelembe vett Petri-csészék (lemezek) száma,

n_2 = a második hígításból figyelembe vett Petri-csészék (lemezek) száma,

d = az első értékelte hígítás faktora.

Az eredményt két értékes számjegyre kerekítve adjuk meg. Amikor a kerekítendő számjegy öt, úgy kerekítsünk, hogy a közvetlenül balra eső szám páros legyen.

Példa:

10^{-2} hígítás: 278 és 290 telep

10^{-3} hígítás: 33 és 28 telep

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

8.3. Ha csak 10-nél kisebb telepszámot határoztunk meg, akkor a milliliterenkénti mikroorganizmusok számát "kevesebb, mint $10 \times d/\text{ml}$ " szöveggel adjuk meg, ahol 'd' a legalacsonyabb hígítási faktor reciprok értéke.

8.4. Ha csak 300-nál nagyobb telepszámot határoztunk meg, de a számolás lehetséges, határozzunk meg egy becsült számot, és szorozzuk be a hígítási faktor reciprok értékével. Az eredményt "Becsült mikroorganizmus szám/ml" szöveggel adjuk meg.

9. Pontosság

Nemzetközileg elfogadott összehasonlító vizsgálati eredmények még nem állnak rendelkezésre.

VI. KOLIFORM SZÁM MEGHATÁROZÁSA – TELEPSZÁMLÁLÁSSAL 30 °C-ON

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás megadja pasztörözött tej esetében a koliform szám meghatározásának referencia eljárását, 30 °C-on történő telepszámlálással.

2. Definíció

A 'koliform' kifejezés alatt olyan baktériumokat értünk, amelyek 30 °C-on jellegzetes vagy nem jellegzetes telepeket hoznak létre, amelyek a leírt körülmények között fermentálják a laktózt, gáz termeléssel.

3. Elv

A minta meghatározott mennyiségét Petri-csészében összekeverik a táptalajjal és 30 °C-on 24 órán át inkubálják. A jellegzetes telepek számát meghatározzák, és amennyiben szükséges, azonosítják a nem jellegzetes telepeket a laktóz fermentálási képesség vizsgálatával. Kiszámítják az 1 ml pasztörözött tejsre vonatkozó koliformok számát.

4. Berendezés és üvegeszközök

Szokványos laboratóriumi berendezések, és különösképpen:

4.1. Berendezések

- 4.1.1. Hőlégmenterizáló, amely 170 és 175 °C között képes működni.
- 4.1.2. Autokláv, amely 121 ± 1 °C-on képes működni.
- 4.1.3. Inkubátor, amely képes bármely belső pontján a hőmérsékletet 30 ± 1 °C-on tartani.
- 4.1.4. pH-mérő, hőmérséklet kompenzált, amely $\pm 0,1$ pH egységig pontos mérést ad.
- 4.1.5. Vízfürdő, amely képes 45 ± 1 °C-on működni.
- 4.1.6. Oltókacs, platina-iridiumból vagy nikkkel-króm ötvözetből készült.

4.2. Üvegeszközök

- 4.2.1. Kémcsövek, megfelelően zárhatóak és 20 ml térfogatúak, a megerősítő táptalaj tárolásához (5.2) és ezekhez a kémcsövekhez megfelelő méretű Durham csövek
- 4.2.2. Lombikok, 150-től 250 ml-es térfogatúak a szilárd szelektív táptalaj tárolásához (5.1).
- 4.2.3. Pipetták (vattával bedugaszolt), üvegből vagy steril szintetikus anyagból készült, ép csúcsú, 1-10 ml névleges térfogatú és kifolyó nyílásának átmérője 1,75-től 3 mm.
- 4.2.4. Petri-csészék, tiszta, szintelen üvegből vagy steril szintetikus anyagból. Az alsó Petri-csésze belső átmérője kb. 90-100 mm. A belső mélység legalább 10 mm. Az alsó részen nem lehetnek rendellenességek, amelyek a telepszámlálást befolyásolhatják.
- 4.2.5. Üvegeszközök sterilizálása

Az üvegeszközöket a következő eljárások egyikének alkalmazásával kell sterilizálni:

- (a) hőlégmenterizálóban legalább 1 óráig 170 és 175 °C között tartani (4.1.1);
- (b) autoklávban legalább 20 percig 121 ± 1 °C-on tartani (4.1.2).

Figyelnünk kell arra, hogy az autoklávban biztosítsuk a megfelelő gőzáthatolást – pl. ha a berendezést tárolóedényben sterilizáljuk, azt ne zárjuk le szorosan, valamint a lombikokra is lazán helyezzük rá a tetőt.

Az autoklávban sterilizált üvegeszközöket gőz kiengedésével kell szárítani.

A pipettákat hőlégmenterizálóban kell sterilizálni (4.1.1).

5. Táptalaj

5.1. Kristályibolya-neutrálvörös-epe-laktóz agar (VRBL agar) szilárd szelektív táptalaj

Összetétel:

Pepton	7 g
Élesztő kivonat	3 g
Laktóz (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Nátrium-klorid (NaCl)	5 g
Epe sók	1,5 g
Neutrálvörös	0,03 g
Kristályibolya	0,002 g
Agar	10-15 g (a használt agar gélképző tulajdonságaitól függően)
Víz	1000 ml

Elkészítés:

Az alkotórészeket szuszpendáljuk és oldjuk fel vízben, majd néhány percre hagyjuk állni, ezután erőteljesen keverjük össze.

A pH mérővel (4.1.4) ellenőrizzük a pH-t, szükség esetén állítsuk be a pH-t, hogy a forralás után az $7,4 \pm 0,1$ legyen 25 °C-on, nátrium-hidroxid vagy sósav oldat (legalább 0,1 mol/l) felhasználásával.

Hirtelen forraljuk fel, időnként körkörös mozgassuk és azonnal töltsük át 100-150 ml-es steril lombikokba (4.2.2). Vízfürdőben (4.1.5), 45 ± 1 °C-on hűtsük le a táptalajt.

A táptalaj sterilitását használatkor ellenőrizni kell (lásd 6.4).

A táptalajt az elkészítéstől számított három órán belül használjuk fel.

5.2. Brillantzöld laktóz epe leves - megerősítő táptalaj

Összetétel:

Pepton	10 g
Laktóz (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Vízmentes marha epe	20 g
Brillantzöld	0,0133 g
Víz	1000 ml

Elkészítés:

Forralással oldjuk fel az alkotórészeket vízben.

A pH mérővel (4.1.4) ellenőrizzük a pH-t, szükség esetén állítsuk be a pH-t, hogy a forralás után az $7,2 \pm 0,1$ legyen 25 °C-on, nátrium-hidroxid vagy sósav oldat (legalább 0,1 mol/l) felhasználásával.

Mérjük szét 10 ml-es Durham csöveket tartalmazó kémcsövekbe (4.2.1). Dugaszoljuk a kémcsöveket.

Sterilezzük autoklávban (4.1.2) 121 ± 1 °C-on 15 percig.

A Durham csövekben a sterilizálás után nem fordulhatnak elő légbuborékok.

Ellenőrizzük a táptalaj pH-ját.

Ha a táptalaj nem kerül azonnal felhasználásra, 0 és 5 °C között sötét helyen tárolva legfeljebb egy hónapig tartható el.

5.3. Kereskedelemben készen kapható vízmentes táptalaj

A táptalaj (5.1, 5.2) elkészíthető kereskedelemben készen kapható vízmentes táptalajból. Kövessük a gyártó utasításait. Állítsuk be a pH-t, mérjük szét a táptalajt, forraljuk fel vagy sterilizzük és tároljuk az 5.1 és 5.2 pontokban leírtaknak megfelelően.

6. Eljárás

6.1. A táptalaj

Az 5.1-ben leírtaknak megfelelően használjuk a táptalajt (VRBL agar).

6.2. A tejminta előkészítése

A tejmintát tartalmazó edény 25-ször történő gyors ide-oda forgatásával alaposan keverjük össze a tejmintát, hogy a mikroorganizmusok eloszlása a lehető legegyszerűbb legyen. A habosodást vagy a hab szétterjedését kerülni kell. A vizsgálati minta összekeverése és a vizsgálatához szükséges mennyiség kivétele között eltelt idő ne legyen három percnél hosszabb.

6.3. Petri-csészék leoltása (inokuláció)

Oltsunk le 3 ml tejmintát (6.2) úgy, hogy steril pipettával (4.2.3) helyezzünk át 1-1 ml tejmintát mind a három Petri-csészébe (4.2.4).

6.4. Lemezöntés

Öntsünk kb. 12 ml VRBL agart (6.1) mindegyik leoltott Petri-csészébe.

Közvetlenül az öntés után a Petri-csésze körkörös mozzgatásával keverjük el az anyagot, hogy az inkubáció után egyenletes eloszlású telepeket kapjunk.

A tejminta előkészítésének befejezése és a vizsgálatához szükséges anyagmennyiség (inokulum) összekeverése között eltelt idő nem lehet 15 percnél több.

Sterilitás ellenőrzése céljából készítsünk egy kontrollt, nem inokulált Petri-csészét, az inokulált Petri-csészék öntéséhez szükséges 12 ml-nyi VRBL agar felhasználásával.

Tiszta, hűvös vízszintes felületen hagyjuk megszilárdulni, amíg a táptalaj megköt.

A teljes szilárdulás után öntsünk legalább 4 ml VRBL agart (6.1) az inokulált táptalaj felületére.

Hagyjuk megszilárdulni.

6.5. Petri-csészék inkubációja

Helyezzük át a csészéket az inkubátorba (4.1.3). Inkubáljuk a megfordított csészéket. Ne rakjunk 6-nál több csészét egymás tetejére. A csésze halmok nem érintkezhetnek egymással vagy az inkubátor falával és tetejével.

Inkubáljuk őket 30 ± 1 °C-on 24 ± 2 órán át.

6.6. Telepszámlálás

6.6.1. A 150-nél kevesebb telepet tartalmazó Petri-csészékben határozzuk meg a telepszámot.

Számláljuk meg a legalább 0,5 mm átmérőjű sötétvörös, csapadékkal körülvelt vagy anélküli telepeket, melyek a koliformokra jellemzőek.

6.6.2. Ha néhány vagy minden telep megjelenése nem jellemző (pl. színben, méretben, csapadékképzésben vagy felépítésben eltér a tipikus telepektől), végezzünk megerősítő vizsgálatot (6.7).

6.7. Megerősítő vizsgálat

A 6.6.2-ben foglaltaknak megfelelően végezzünk megerősítő vizsgálatot megfelelő számú (pl. három-öt) nem jellemző teleppel, brillantzöld-laktóz-epe levest tartalmazó (5.2) kémcsövekbe történő leoltással, melyhez használjunk oltókacsot (4.1.6). A kémcsöveket inkubáljuk 30 ± 1 °C-on 24 ± 2 óráig.

Azokat a telepeket, amelyek gázt termelnek a Durham csövekben, tekintsük bizonyítottan koliformoknak.

7. Az eredmények kiszámítása és megadása

7.1. A 150 telepnél kevesebbet tartalmazó csészékben megszámlolt telepeket vegyük figyelembe a számításnál. (lásd 7.4).

7.2. Ha megerősítő vizsgálatot végzünk, a bizonyítottan koliform telepek százalékából számítsuk ki a koliform telepek számát.

7.3. 1 ml pasztörözött tej koliform száma a következő formula alapján számítható ki:

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

ahol:

$\sum C$ = az összes koliform telepek száma (7.1 a 7.2-vel kapcsolatosan), amely a tejminta vizsgálata során került megállapításra (3 ml),

n = a megvizsgált minta milliliter száma (6.3) (3 ml).

Ha 100-nál több a telepek száma, az eredményt két értékes számjegyre kerekítve adjuk meg. Amikor a kerekítendő számjegy öt, úgy a közvetlenül balra eső páros számra kerekítünk.

Ha csak 150-nél nagyobb a telepszám, az eredményt „Becsült koliformszám/1 ml” szöveggel adjuk meg.

8. Pontosság

Nemzetközileg elismert összehasonlító vizsgálati eredmények nem állnak rendelkezésre.

VII. SZOMATIKUS SEJTSZÁM MEGHATÁROZÁSA

Ez az eljárás két referencia eljárást ad meg a szomatikus sejtszám meghatározására:

- A. Mikroszkópos módszer
- B. Fluoro-opto-elektronikus módszer

A. Mikroszkópos módszer

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás a nyers tejre vonatkozólag adja meg a szomatikus sejtszám meghatározás referencia eljárását.

Ez az eljárás megadja a tejmintára vonatkozólag a sejtszám meghatározás eljárását, amelynek segítségével a fluoro-opto-elektronikus eljárás kalibrálható és pontossága ellenőrizhető.

(lásd B.1).

2. Definíció

Ezen eljárás során szomatikus sejtek azok a sejtek, pl. leukociták és epitheliális sejtek, amelyek sejtmagja metilénkék használatakor erőteljesen megfestődik.

3. Elv

0,01 ml tejet eloszlatnak 1 cm²-nyi tárgylemez felületen. A kenetszerű réteget megszáritják és megfestik. A számmeghatározás mikroszkóp segítségével történik. Adott területen meghatározott szomatikus sejtek számát beszorozzák a munkafaktoral, így megkapják a sejt/ml számot.

4. Reagensek

Analitikai minőségű vegyi anyagokat kell használni.

Festékoldat:

Összetétel:

Metilénkék	0,6 g
Etanol - 99%-os	54,6 ml
1,1,1-triklóretán vagy tetraklóretán	40,6 ml
Jégecet	6,6 ml

Figyelmeztetés

A tetraklóretán mérgező. Használatakor az elkészítést és alkalmazást elszívófülkében kell végezni.

Elkészítés:

Üvegben keverjük össze az etanolt és az 1,1,1-triklóretánt vagy tetraklóretánt, és melegítsük vízfürdőben 60-70 °C-ra. Adjuk hozzá a metilénkéket, óvatosan keverjük össze, hűtőszekrényben hűtsük le 12-24 órán át 4 °C-ra, majd adjuk hozzá a jégecet. Legfeljebb 10-12 mikron pórusméretű szűrőn szűrjük át, és a festékoldatot tároljuk légmentesen záródó üvegben. Ha szemcsék vagy üledék képződne, használat előtt újra szűrjük át az oldatot.

5. Berendezés és üvegeszközök

- 5.1. Mikroszkóp, 500 ×-tól 1000 ×-es nagyítású.
- 5.2. Mikrofecskendő, 0,01 ml-es, legalább ± 2% pontosságú.
- 5.3. Tárgylemez, 20 mm x 5 mm területjelöléssel ellátott a meghatározáshoz, vagy közönséges mikroszkóp tárgylemez 20 mm x 5 mm-t kijelölő sablonnal a mintakenet készítéshez.
- 5.4. Vízszintes melegítőlap, (30-50 °C) a lemezek szárításához.
- 5.5. Ventilátor (hajszárító), a kenet szárításához.
- 5.6. Vízfürdő, amely 30-40 °C között képes működni, a tejminta melegítéséhez.
- 5.7. Mikrométer tárgylemez, 0,01 mm-es beosztással.

6. Eljárás

6.1. Tejminta

A tejmintát a mintavételtől számított hat órán belül kell megvizsgálni. A tárolás során a minta hőmérséklete nem lehet 6 °C-nál magasabb. A fagyást el kell kerülni.

6.2. A minta elkészítése laboratóriumban

Melegítsük fel a mintát vízfürdőben (5.6) 30-40 °C-ra. Ezután óvatosan keverjük meg, majd hűtsük arra a hőmérsékletre, amelyen a mikrofecskendőt (5.2) kalibrálták, pl. 20 °C-ra.

6.3. A lemezek előkezelése

A lemezeket tisztítsuk meg (5.3), pl. etanollal, szárítsuk meg pormentes papírral, majd lángba tartva, és hűtsük le. A porosodás elkerülése érdekében tároljuk dobozban.

6.4. A kenet elkészítése

Mikrofecskendő segítségével (5.2) vegyünk ki 0,01 ml tejet a fenti módon elkészített mintából. Alaposan tisztítsuk meg a fecskendő külső részét, amely érintkezett a tejjel. Helyezzük a fecskendőt a lemezre (5.3), töltsük ki a tejmintát a 20 mm x 5 mm-es területre úgy, hogy először a terület körvonalait jelöljük ki azzal, majd kitöltve területet olyan egyenletesen, amennyire az lehetséges. Szárítsuk a kenetet vízszintes melegítőlapon (5.4) a teljes száradásig.

Minden tejmintából legalább két párhuzamos kenetet kell készíteni és megvizsgálni.

6.5. A kenetek megfestése

Mártsuk 10 percre festékoldatba (4). Szárítsuk, ha szükséges, ventilátorral befejezve a műveletet (5.5). Mártsuk a keneteket csapvízbe, amíg az összes felesleges színezék ki nem mosódik. Ezután szárítsuk újra és tároljuk portól védve.

6.6. A mikroszkopikus mező kalibrációja

A választott nagyítástól függően (500 ×-tól 1000 ×-ig) a mikrométer tárgylemez (5.7) segítségével határozzuk meg a mikroszkóp látómező átmérőjét.

7. Számolás és számítás

7.1. Sejtszám meghatározása

Használjunk mikroszkópot (5.1). Nem a sejteket számoljuk meg, hanem csak a sejtmagok számát. Ezeket határozottan fel lehet ismerni, és a számláláshoz legalább a sejtmag felének láthatónak kell lennie a mikroszkóp mezőjében. Számoljuk meg a sejteket a kenet középső harmadában lévő sávokban vagy mezőkben, ne kizárólag a kenet periférikus területeiről választott sávokat és mezőket értékeljük ki. A kenet különböző részeinek megszámlálásával havonta egyszer ellenőrizzük azt, hogy a kenet megfelelően van-e elkészítve és így az eredmények megbízhatók-e. A számlálást úgy kell elvégezni, hogy a mintakenet minden része egyenlő mértékben legyen képviselve.

7.2. A meghatározandó minimális sejtszám

Mivel a mikroszkópos szomatikus sejtszám meghatározást az automatikus és műszeres számlálás standardizálására is lehet használni, az azonos minták számolásának variációs együtthatója nem lehet magasabb, mint az elektronikus berendezéseké. 400 000 – 600 000 sejt/ml-t tartalmazó tejmintánál a variációs koefficiens nem lehet magasabb, mint 5%.

A mintákban megszámlálandó szomatikus sejtek száma a Poisson eloszlás jellegzetességeinek megfelelően legalább 400 kell legyen azért, hogy ezen ismételtetőségi kitétel érvényesüljön.

A Poisson eloszlás feltétele

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

ahol

M = az átlag érték,

V = a variancia,

s = a standard deviáció.

A variációs koefficiens:

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

M = (átlag) jelzi a megszámlált részecskék (sejtek) számát (azaz 400-at CV = 5%-nál).

7.3. A munka faktor kiszámítása

0,01 ml tej felhasználásával a munka faktort a 7.3.1 vagy a 7.3.2 pontban foglaltaknak megfelelően kell kiszámítani.

7.3.1. A keneten található sávok számának meghatározása

A megszámlálandó sávok hossza egyenként 5 mm. A sávok szélessége megfelel a mikrométer tárgylemez segítségével meghatározott mikroszkóp látómező átmérőjének (5.7).

$$\text{Munka faktor} = \frac{20 \times 5 \times 100}{d \times b},$$

ahol:

d = a mikrométer tárgylemez által meghatározott mikroszkóp mező átmérője (5.7),

b = a kiértékelt sávok száma.

7.3.2. A kenet középső harmadában található, vagy rácshálóval meghatározott mikroszkóp látómezők száma:

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

ahol:

d = a mikrométer tárgylemez lemez által meghatározott mikroszkóp látómező átmérője (5.7),

s = a meghatározott mezők száma.

7.4. Sejt tartalom kiszámítása

A meghatározott szomatikus sejtek számát (7.1 és 7.2) megszorozzuk a munka faktoral (7.3), így megkapjuk egy ml tej sejt tartalmát.

7.5. Pontosság

A variációs együttható (lásd 7.2) nem lehet nagyobb 5%-nál.

Nemzetközileg elfogadott körvizsgálati eredmények nem állnak rendelkezésünkre.

B. Fluoro-opto-elektronikus módszer

1. Alkalmazási kör és terület

Ez az eljárás meghatározza azt a referencia eljárást, amely megfelelő kalibráció (lásd A.1) után a kémiai tartósított vagy tartósítatlan nyers tej szomatikus sejtszámának meghatározásához használható.

2. Definíció

Ezen eljárásnál a szomatikus sejtek alatt olyan részecskéket értünk, amelyek a szomatikus sejtek sejtanyagában lévő DNS megfestődéséből adódóan minimális fluoreszcenciát mutatnak.

3. Elv

A minta egy részét (pl. 0,2 ml) puffer és fluoreszkáló oldattal alaposan összekeverik. Majd ennek a keveréknek egy részét vékony réteg formájában ráviszik egy forgótárcsára, amely mikroszkóp tárgylemezként funkcionál.

Minden sejt elektromos impulzust kelt, amelyet felerősítenek és regisztrálnak. A szomatikus sejtszám ezer/ml-ben van megadva.

4. Reagensek

Ha arról másként nem rendelkeznek, analitikai minőségű vegyi anyagokat kell használni. A víznek desztillálnak vagy ionmentesítettnek, illetve azokkal egyenértékű tisztaságúnak kell lennie.

4.1. Puffer oldat

Összetétel:

Kálium-hidrogén-ftalát	51,0 g
Kálium-hidroxid	13,75 g
Polietylénglikol-mono-p(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil-éter (pl. Triton X-100), a térfogat 1%-ában	10 ml
pH: 5,7-5,9. Engedjük fel vízzel	10000 ml-re.

Elkészítés:

Az alkotórészeket összekeverjük. Légmentesen legfeljebb hét napig tároljuk.

4.2. Fluoreszkáló oldat (törzsoldat)

Összetétel:

Etidium-bromid	1,0 g
Engedjük fel	1000 ml-re.

Elkészítés:

Az etidium bromidot feloldjuk vízben. Tároljuk fényt át nem eresztő, légmentesen zárható üvegben, legfeljebb két hónapig.

4.3. Fluoreszcens oldat (munkaoldat)

20 ml törzsoldatot (4.2) összekeverünk puffer oldattal (4.1), hogy 1000 ml-t kapjunk. A munkaoldatot legfeljebb hét napig lehet használni.

4.4. Tisztító oldat

Összetétel:

Puffer oldat (4.1)	10 ml
Polietylénglikol-mono-p(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil-éter (pl. Triton x-100), a térfogat 1%-ában	10 ml
Ammónia, 25 térfogat %-os	25 ml
Engedjük fel	10 000 ml-re.

Elkészítés:

Az alkotórészeket összekeverjük. Legfeljebb 30 napig tároljuk.

5. Berendezés és üvegeszközök

5.1. Fluoreszcens optikai elven működő számláló műszer.

Megjegyzés:

Használat előtt a műszert kalibrálni kell. Így határozzuk meg az összefüggést a megszámlálendő részecskék térfogata és azon küszöbszint között, amely felett a számmeghatározás történik.

A kalibrációt a gyártó utasításainak megfelelően végezzük el, olyan minták felhasználásával, amelyek sejtartalmát mikroszkópos eljárással határoztuk meg (A).

5.2. 40 ± 1 °C-on működtethető cirkulációs vízfürdő.

5.3. Megfelelően zárható kb. 15 ml-es kémcsövek.

6. Tejminta

6.1. A mintát kémcsőben alacsony hőmérsékleten tároljuk (5.3). Ha a minta nem tartalmaz tartósítószert, a számlálást maximum a fejestől számított 24 órán belül el kell végezni, mert egyébként a szám túl alacsony lesz. A tárolási hőmérséklet nem haladhatja meg a 6 °C-ot.

6.2. Tartósítás

A vegyi tartósítást 24 órán belül el kell végezni. A tartósítást a mintavétel után a lehető legrövidebb időn belül el kell végezni.

6.2.1. A minta vegyi tartósítása a következő tartósítószerrel valamelyikének felhasználásával történhet:

– ortobórsav:

az ortobórsav végső koncentrációja nem haladhatja meg a 0,6 g/100 ml-t. Az így tartósított minta legfeljebb 24 óráig tartható el 6-12 °C között,

– kálium-dikromát:

a kálium-dikromát végső koncentrációja nem haladhatja meg a 0,2 g/100 ml-t. Az így tartósított minta legfeljebb 72 óráig tartható el 6-12 °C között,

– nátrium-azid:

a nátrium-aziddal tartósított minta végső koncentrációja 0,024 g/100 ml lehet, ha a mintát közvetlenül a mintavételt követően 6-12 °C közé hűtik le, és a mintavételt követő 48 órán belül meghatározzák a számot.

– bronopol:

a bronopollal tartósított minta végső koncentrációja 0,05 g/100 ml lehet, ha a mintát közvetlenül a mintavételt követően 6 -12 °C közé hűtik le, és a mintavételt követő 72 órán belül meghatározzák a számot.

6.2.2. A már ortobórsavval tartósított mintát 48 órára kálium dikromáttal tovább lehet tartósítani.

Megjegyzés:

A kálium-dikromáttal tartósított minták eltávolításával kapcsolatban figyelembe kell venni a helyi szennyvízre vonatkozó előírásokat.

7. Eljárás

7.1. A minta előkezelése

A vizsgálandó tejet a lefejtés után legalább 24 óráig körülbelül 2-6 °C között kell tárolni. Nem javasolt az előkezelés nélküli mintákban a tejelevétel napján történő számmeghatározás, mivel az eredmények túl alacsonyak lehetnek. Ha ilyen mintánál szükséges számmeghatározást végezni, kezeljük azt legalább három óráig kálium-dikromáttal. (lásd 6.2.1).

7.2. Előkészítés

Az előkezelt mintát (lásd 7.1), vagy a legalább egy napos kezeletlen mintát vízfürdőben kb. 40 °C-ra melegítjük (5.2). A továbbiakban a mintát szobahőmérsékleten tároljuk a számmeghatározás befejezéséig.

7.3. Sejtszám meghatározás

A meghatározás számláló műszer (5.1) segítségével történik, a melegítés befejezésétől számított 15 percen belül (lásd 7.2). Közvetlenül a mérés megkezdése előtt a mintát alaposan keverjük össze, hogy a lehető leghomogénebb szomatikus sejteloszlás biztosított legyen.

A minta további hígítása és előkészítése automatikusan a berendezésben történik.

8. Pontosság

Az ismételhetőségre (r) és reprodukálhatóságra (R) vonatkozó nemzetközi körvizsgálati adatok nem állnak rendelkezésre. A jövőben a precíziós adatok megadásra kerülnek.

A nemzeti szinten hozzáférhető adatok a következő becslésekre adnak lehetőséget:

400 000 és 500 000/ml közötti sejtszám:

- az ismételhetőségre vonatkozó standard eltérés:
 $s_r = 20\ 000$ sejt/ml (megfelel az 5-4%-os variációs együtthatónak),
- a reprodukálhatóságra vonatkozó standard deviáció:
 $s_R = 40\ 000$ sejt/ml (megfelel 10-8%-os variációs együtthatónak).

9. A pontosság ellenőrzése

Nemzeti referencia laboratóriumban mikroszkópos sejtszám meghatározással elemzett, ismert sejttartalmú mintákkal pontossági ellenőrzést végeznek.

VIII. ANTIBIOTIKUMOK ÉS SZULFONAMIDOK KIMUTATÁSA

ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉG ÉS TERÜLET

Ez az eljárás meghatározza a nyers és a hőkezelt tejben megtalálható antibiotikumok és szulfonamidok kimutatásának referencia eljárását.

A referencia eljárás részei:

A. Kvalitatív módszer

Ez az a kezdő eljárás, amellyel az antibiotikumokat - beleértve a szulfonamidokat - tartalmazó tejmintákat kiválasztjuk. A leírt eljárás számos hasonló eljárás egyike, amely során lényegében mindenhol *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATTC 10149 a teszt organizmus. A kiválasztott eljárás ezekre a vizsgálatokra vonatkozóan reprezentatív.

B. A penicillin megerősítő vizsgálatára, azonosítására és mennyiségének meghatározására vonatkozó eljárás

Ezt az eljárást kell alkalmazni a kvalitatív eljárás eredményeinek megerősítésére, a penicillin azonosítására és koncentrációjának meghatározására.

A. Kvalitatív eljárás**1. Az alkalmazás lehetősége és területe**

Ez az eljárás meghatározza a nyers és a hőkezelt tejben előforduló antibiotikumok és szulfonamidok kvalitatív kimutatásának módszerét, az alábbi táblázatban megadott határértékek feletti mennyiségek esetén:

Kimutatható koncentrációk a különböző antibiotikumok és szulfonamidok esetében ⁽¹⁾

	Teszt érzékenység	
	Mindegyik negatív	Mindegyik pozitív
Benzilpenicillin	0,002	0,006
Ampicillin	0,002	0,005
Cloxacillin	0,015	0,035
Nafcillin	0,006	0,011
Tetracyclin	0,10	0,40
Oxytetracyclin	0,20	0,45
Chlortetracyclin	0,15	0,50
Chloramphenicol	7,	15,
Dihydrostreptomycin	4,	13,
Neomycin	1,	22,
Kanamycin	9,	28,
Bacitracin	0,06	0,14
Erythromycin	1,	2,25
Rifamycin	0,01	0,14
Diaphenylsulfon	0,01	0,1
Sulphamethazin (Sulphadimidin)	0,5	1,

⁽¹⁾ A benzilpenicillin és a bacitracin IU/ml-ben kifejezve, a többi antibiotikum µg/ml-ben

2. Definíció

A tej antibiotikumot vagy szulfonamidot tartalmaz, ha a táptalaj színe nem változik meg (lásd 7.1).

3. Elv

A tápanyagokkal együtt a tejmintát hozzáadjuk a *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 spórákat (lásd 5.4.1) és pH indikátort tartalmazó agar táptalajhoz, amelynek jó az általános érzékenysége, és különösen érzékeny a penicillin által okozott gátló hatásra. A baktérium normál növekedése és savtermelése eredményeként a pH indikátor bíbor színűről sárga színűre változik. A baktérium fejlődésére gátló hatású anyagok tejben való jelenléte esetén a pH indikátor színe nem változik, bíborszínű marad.

4. Berendezések és üvegeszközök

A szokásos laboratóriumi berendezések, és különösen:

4.1. Berendezések

4.1.1. Inkubátor, amely a hőmérsékletet 64 ± 1 °C-on képes tartani.

4.1.2. 64 ± 1 °C-on működni képes vízfürdő.

4.1.3. Tartó (állvány), a kémcsövekhez és ampullákhoz.

4.1.4. Pipetta, 0,1 ml térfogatú, egyszer használatos eldobható hegygel, amely alkalmas a minta kivételéhez és szétméréséhez.

- 4.1.5. Fogók és csipeszek.
- 4.1.6. Hőlégmenterizáló, amely 170-175 °C-on képes működni.
- 4.1.7. Autokláv, amely 121 ± 1 °C-on képes működni.
- 4.1.8. pH-mérő.

4.2. Üvegeszközök

- 4.2.1. Mintatartó üvegek, megfelelő zárófedéllel.

Megjegyzés:

Néhány gumidugó gátló hatású anyaggal szennyezheti az üveg nyakát.

- 4.2.2. Petri-csészék, tiszta, szintelen üvegből és steril szintetikus anyagból készült, sima aljú, legalább 140 mm belső átmérőjű.
- 4.2.3. Üvegpalackok, 250 ml térfogatúak.
- 4.2.4. Pipetták (vatta dugóval ellátva) üvegből vagy steril szintetikus anyagból készültek, 1 ml és 10 ml névleges térfogatúak.
- 4.2.5. Üveg spatulák.
- 4.2.6. Kémcsövek és ampullák, kb. 8 mm belső átmérőjűek, zárókupakkal és dugóval.
- 4.2.7. Üvegeszközök sterilizálása.

Az üvegeszközöket a következő eljárások valamelyikével kell sterilizálni:

- (a) hőlégmenterizálóban legalább 1 óráig 170 és 175 °C között tartani (4.1.6);
- (b) autoklávban legalább 20 percig 121 ± 1 °C-on tartani (4.1.7).

Figyelni kell arra, hogy az autoklávban biztosítsuk a megfelelő gőzáthatolást – pl. ha az eszközt tárolóedényben sterilizáljuk, azt ne zárjuk le szorosan, valamint a lombikokra is lazán helyezzük rá a tetőt.

Az autoklávban sterilizált üvegeszközöket gőz kiengedéssel kell szárítani.

A pipettákat hőlégmenterizálóban kell sterilizálni.

5. Táptalaj, oldatok, teszt organizmus

A táptalaj összetevőinek bakteriológiai vizsgálati célokra alkalmasnak kell lenniük. A felhasznált víz desztillált, vagy legalább ugyanilyen tisztaságú demineralizált legyen. Nem tartalmazhat olyan anyagokat, amelyek gátló hatásúak a teszt organizmusra nézve.

5.1. Táptalaj

5.1.1. Tápagar

Összetétel

Élesztő kivonat	2 g
Pepton	5 g
Hús kivonat	1 g
Nátrium-klorid	5 g
Agar	10-15 g
Víz	1000 ml

Elkészítés

Az alkotórészeket oldjuk fel vízben. Melegítsük forrásig, időnként körkörösén mozgassuk. Állítsuk be a pH-t, hogy az a sterilizálás után $7,4 \pm 0,1$ legyen $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Mérjük szét 10 ml-es mennyiségeket kémcsövekbe a ferde agar készítéséhez, vagy 100 ml-es mennyiségeket üveg palackokba.

Sterilezzük $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 15 percig.

5.1.2. Agar táptalaj

Összetétel

Nátrium-klorid	2 g
Agar	15 g
Víz	1000 ml
Trimetoprim vagy Tetroxoprim oldat (lásd 5.1.3)	10 ml

Elkészítés

Az alkotórészeket a trimetoprim vagy tetroxoprim kivételével oldjuk fel vízben. Melegítsük forrásig, időnként körkörösén megmozgatva az edényt. Adjuk hozzá a trimetoprimet vagy tetroxoprimet és sterilizzük $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 15 percig; állítsuk be a pH-t, hogy a sterilizációt követően az $7,0 \pm 0,1$ legyen $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

5.1.3. Trimetoprim vagy Tetroxoprim oldat

Összetétel

Trimetoprim	5 mg
vagy Tetroxoprim	30 mg
Etanol 96%-os	5 ml/30 ml
Víz	1000 ml-re

Elkészítés

Oldjuk fel a trimetoprimet vagy tetroxoprimet 5 ml (vagy 30 ml) etanolban és hígítsuk fel a vízzel.

5.1.4. Tápközeg

Összetétel

Élesztő kivonat	0,75 mg
Glükóz	5,0 mg
Oldható keményítő	8,0 mg
Brómkrezol bíbor	0,025 g
Víz	50 ml-re

Elkészítés

A tápanyagokat és az indikátort oldjuk fel vízben, ha szükséges melegítsük, és sterilizzük szűrővel. A tápközeg kereskedelmi forgalomban készen kapható tablettá formában.

5.2. Standard penicillin oldat

5.2.1. Megfelelően zárható steril üvegben készítsünk $60\text{ }\mu\text{g/ml} = (100\text{ IU/ml})$ penicillin oldatot kristályos nátrium- vagy kálium-benzylpenicillin steril desztillált vízben történő feloldásával.

- 5.2.2. Készítsünk penicillin munkaoldatot 1,25 ml penicillin oldat (5.2.1) steril desztillált vízzel 1000 ml-re történő feltöltésével. A munkaoldat 0,075 µg/ml (= 0,125 IU/ml) penicillint tartalmaz.
- 5.2.3. Készítsünk 75 ml standard penicillin oldatot, 71 ml gátlóanyag mentes tej (5.3) és 4 ml penicillin munkaoldat (5.2.2.) összekeverésével, így a standard penicillin oldat 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml) penicillint tartalmaz.
- 5.2.4. Az 5.2.1 - 5.2.3-ban említett penicillin oldatokat a vizsgálat elvégzésének napján kell elkészíteni.

5.3. Gátlóanyag-mentes tej

Kontrollként készítsünk gátlóanyag-mentes tejet a már korábban vizsgált és gátlóanyag-mentesnek bizonyult sovány tejpör (10% m/v) steril desztillált vízben történő feloldásával. Másik megoldásként megfelelő mennyiségű, előzetes vizsgálattal gátlóanyag-mentesnek bizonyult friss tanktejből mérjünk üvegpalackokba, majd egy órán át melegítsük 100 °C-on és ezután tároljuk hűtőszekrényben 0 - 6 °C között, legfeljebb egy hétig.

5.4. Teszt organizmus

- 5.4.1. *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 tenyészet használatos teszt organizmusként, amely azonos a C 953-al.
- 5.4.2. Készítsünk törzstenyészetet a tesztkulturá fenntartásához. A tesztkulturát ferde tápagon tároljuk (5.1.1). Ferde tápagart oltókacs segítségével felületi sávban oltunk le tesztkulturával, és inkubáljuk aerob körülmények között 48 óráig 63 ± 1 °C-on. Az inkubációt követően a kémcsövet zárjuk le steril gumi dugóval. Az így kapott törzstenyészet hűtőszekrényben 0 - 5 °C között több hónapig eltartható.

5.5. Tesztkulturá (spóra szuszpenzió)

- 5.5.1. 20 ml tápagart (5.1.1) aseptikus módon átvisszünk steril Petri-csészébe (4.2.2), és szobahőmérsékletre lehűtjük.
- 5.5.2. Steril pipettával (4.2.4) mérjünk be 5 ml steril desztillált vizet egy törzstenyészetet tartalmazó kémcsőbe (5.4.2), mossuk le a ferde agarról a spórákat steril oltókacs segítségével. Ezt a spóra szuszpenziót 0 - 5 °C között kell tárolni és 36 órán belül fel kell használni.
- 5.5.3. Steril pipettával (4.2.4) mérjünk rá 0,5 ml spóra szuszpenziót (5.5.2) egy tápagar lemez felületére (5.5.1) és az inokulumot alaposan szélesszük el a teljes felületen egy hajlított üvegbottal. Inkubáljuk 63 ± 1 °C-on (4.1.1) 16 - 18 órán át.

Ha törzstenyészetet használunk (5.4.2), vagy olyan kultúrát, amely több mint 36 órás, a szubkulturá képzést legalább kétszer meg kell ismételnünk, legfeljebb 36 óras időközzel.

- 5.5.4. Steril pipettával (4.2.4) mérjünk 10 ml desztillált vizet a spóra szuszpenzióval inokulált és inkubált tápagar lemez felületére (5.5.3), majd egy üvegbot segítségével mossuk le a spórákat a felületről, spóra szuszpenziót képezve.

Vigyük át a spóra szuszpenziót egy 250 ml steril desztillált vizet tartalmazó üveg palackba (4.2.3). Zárjuk le a palackot és alaposan rázzuk fel. Azokat a tenyészeteket, amelyekből nem akarunk szubkulturát képezni, azonnal hűtőszekrénybe kell tenni és 0-6 °C között tárolni.

- 5.5.5. A spóra szuszpenzió 5 és 10 millió/ml közötti életképes telepszámmal kell rendelkezzen, 16 -18 óráig 63 ± 1 °C-on inkubált agar táptalajon kapott összecsíraszám eredménye alapján. A spóra szuszpenzióknak egységesen kell zavarosnak lennie, és ha pehely vagy üledék található benne, nem használható fel és új spóra szuszpenziót kell készíteni a törzstenyészetből (5.4.2).

5.6. A teszt kémcsövek/ampullák elkészítése

- 5.6.1. Olvasszuk fel az agar táptalajt (5.1.2), majd hűtsük le 55 °C-ra.

- 5.6.2. Kémcsőben vagy üvegben adjunk egy rész friss spóra szuszpenziót (5.5.4) öt rész agar táptalajhoz (5.6.1) és alaposan keverjük össze.
- 5.6.3. A leoltott tápközegből 0,3 ml-t (5.6.2) mérjük be steril kémcsőbe vagy ampullába (4.2.6), amely hozzávetőleg 5 mm vastag réteget fog képezni, és dugóval, zárókupakkal vagy az edény végének megolvasztásával zárjuk le. Helyezzük a kémcsöveket/ampullákat függőleges helyzetbe, hogy a közeg megszilárduljon és legalább 12 óráig hagyjuk állni.
- 5.6.4. A kémcsöveket/ampullákat fel lehet használni ugyanazon a napon, de több hónapig is eltarthatók, ha az elkészítés után közvetlenül lehűtésre kerülnek és 0-6 °C között tárolják őket.

6. Eljárás

6.1. *A mintákat, amilyen hamar csak lehet, vizsgálni kell, lehetőleg a mintavételt követő 24 órán belül, és a vizsgálatig 0 és 5 °C között kell tartani. Amennyiben nincs lehetőség a minták 24 órán belüli vizsgálatára, úgy azokat mélyhűtőben kell tárolni (-30-tól -15 °C-on) a penicillin inaktiválódásának minimalizálása érdekében.*

6.2. *Jelöljük meg minden kémcsövet/ampullát (5.6) olvashatóan és letörölhetetlen írással. Távolítsuk el a zárókupakot vagy a dugót. A vizsgálandó mintákhoz és a kontrollokhoz (5.2 és 5.3) szükséges darabszámot helyezzük rá egy arra alkalmas tartóra. (4.1.3).*

6.3. *50 mikrolitert mérjük be az 5.1.4 pontban említett tápanyagból a kémcsövekbe/ ampullákba.*

6.4. *Alaposan keverjük össze a tejmintákat és 0,1 ml-t mérjük be egy megfelelően jelölt kémcsőbe/ampullába pipetta segítségével (4.1.4). Használjunk tiszta, eldobható hegyet mindegyik bemért mintához.*

6.5. *A 6.4-ben részletezett műveletet ismételjük meg párhuzamos vizsgálatként, de a tejminta helyett standard 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml) penicillin oldattal (5.2.3).*

6.6. *A 6.4-ben részletezett műveletet ismételjük meg párhuzamosként, de a tejminta helyett gátlóanyag mentes tejjel (5.3).*

6.7. *Zárjuk le a kémcsöveket/ampullákat és helyezzük tartóval együtt vízfürdőbe (4.1.2) és 63 ± 1 °C-on 2 - 4 órán át, de legalább 2 óra hosszat inkubáljuk.*

6.8. *Vegyük ki a kémcsöves/ampullás tartót a vízfürdőből.*

6.9. *Figyeljük meg a teszt közeg színét (lásd 7).*

7. Az eredmények értelmezése

7.1. *A táptalaj bíbor színe, bármely kémcsőben/ampullában (tejmintát tartalmazó vagy kontroll) jelzi, hogy a mintában antibiotikum vagy szulfonamid van jelen, az A.1 táblázatában megadott "mindegyik pozitív"-nak megfelelő szinten vagy a szint körüli mennyiségben. A kémcsövek/ampullák standard penicillin oldattal készítve (6.5) bíborszínűek kell, hogy maradjanak annak igazolására, hogy a teszt közeg megfelelő érzékenységű.*

7.2. *Bármelyik tejmintát tartalmazó kémcső/ampulla esetén, ha a táptalaj csak részben marad bíbor színű vagy rendellenes elszíneződésű lesz, akkor a táblázatban megadott szintek közötti mennyiségben van jelen gátlóanyag a mintában.*

7.3. *A táptalaj sárga elszíneződése bármely tejmintát tartalmazó vagy kontroll kémcsőben/ampullában a teszt organizmusra nézve gátló hatású anyagoknak a hiányát mutatja.*

7.4. Ha az összes vizsgált kémcső/ampulla, beleértve a negatív kontrollt is, bíborszínű lesz, ez azt jelenti, hogy a kémcsövek/ampullák nem tartalmaznak életképes spórákat és a mintákat frissen elkészített teszt anyagokkal újra meg kell vizsgálni.

8. Az eredmények megerősítése

8.1. A 7.1 és 7.2-ben részletezett reakciókat mutató minden mintát erősítsünk meg a 'B módszer' szerint.

Ha a megerősítés előtt a tejmintákat tárolni kell, azokat mélyhűtőben kell tartani, hogy megelőzzük az antibiotikumok lebomlását.

B. Eljárás a penicillinek megerősítésére és a koncentráció meghatározása

1. Alkalmazási kör és terület

Az eljárás megadja a penicillinek vagy a velük együtt előforduló más antibiotikumok megerősítésére irányuló vizsgálat eljárását, valamint a tejmintában lévő penicillin koncentráció meghatározására szolgáló eljárást, pozitív (A.7.1) vagy kétes (A.7.2) eredmény esetében.

Az eljárás érzékenysége a különböző antibiotikumokra

Lásd A.1.

2. Definíció

2.1. A tejminta akkor tartalmaz antibiotikumokat, beleértve a szulfonamidot, ha a leírt eljárás szerint vizsgálva a tesztkorong körül a gátlóhatás következtében kialakuló, legalább 2 mm-es feltisztult zónát kapunk.

2.2. Ha az antibiotikumokat, beleértve a szulfonamidot (2.1) tartalmazó minta, amelyhez penicillinázt (betalaktamázt) adtak hozzá, nem mutat feltisztult zónát, vagy a feltisztult zóna átmérője kisebb, mint a penicillináz nélkülié, akkor a mintában lévő gátlóanyag vagy penicillin, vagy penicillin is és valamilyen más antibiotikum is, beleértve a szulfonamidokat.

2.3. Ha a zóna nem inaktíválódik a penicillázra (2.2), a gátlóanyag a tej mintában nem penicillin, hanem egyéb maradékanyag (residuum) lehet. (lásd 85/397/EGK irányelv, A. Függelék, VI. fejezet, A.1.f. és 2 b).

Néhány felszintetikus penicillin, pl. a nátrium cloxacillin nem, vagy nem teljes mértékben inaktíválódik a penicillázra, vagy teljesen rezisztens, és ezért nem azonosítható penicillinként (lásd 7.3).

3. Elv

Abszorbens papírkorongot a vizsgálandó tejjel impregnálnak, ezt egy *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactisszal* leoltott agartáptalaj felszínére helyezik. Az inkubáció során normál esetben a baktériumfejlődés következtében az agar táptalaj opálos lesz. A tejben a növekedést gátlóanyagok jelenlétét jelzi a korong körül kialakuló feltisztult zóna. A feltisztult zóna mérete többek között a tejben lévő gátlóanyag koncentrációjától és típusától függ.

4. Berendezések, üveg- és egyéb eszközök

4.1. Berendezések

4.1.1. Lásd A.4.1.

4.1.2. Vízfürdő, amely képes 80 ± 1 °C-on működni.

4.2. Üvegeszközök

Lásd A.4.2.

4.3. Gátóanyag-mentes papír korongok, 9-13 mm-es átmérővel, amelyek körülbelül 130 mg tejet képesek magukban tartani (lehetőleg exszikkátorban tárolandók).

5. Táptalaj, standard oldatok, penicillináz oldatok, reagensek, teszt organizmusok, stb.

A táptalaj alkotórészeinek bakteriológiai célokra alkalmasnak kell lennie. A felhasznált víz desztillált vagy legalább ugyanolyan tisztaságú demineralizált víz legyen. Nem tartalmazhat a teszt organizmusra nézve gátló hatású anyagokat.

5.1. Táptalaj

5.1.1. Tápagar (A.5.1.1)

5.1.2. Teszt táptalaj a gátóanyagok kimutatására

Összetétel

Élesztő kivonat	2,5 g
Tripton	5 g
Glükóz	1 g
Trimetoprim vagy Tetroxoprim oldat (A.5.1.3)	10 ml
Agar	10-15 g (a gélképző tulajdonságtól függően)
Víz	1000 ml

Elkészítés

A szilárd alkotórészeket vízben melegítés és keverés közben feloldjuk a trimetoprim vagy a tetroxoprim oldat hozzáadása előtt. A trimetoprim vagy tetroxoprim oldat hozzáadását követően a pH-t be kell állítani, hogy az a sterilizálás után $8,0 \pm 0,1$ legyen 25 °C -on. A táptalajt 15 percig $121 \pm 1\text{ °C}$ -on sterilizzük.

5.2. Standard penicillin oldatok tejben

lásd A.5.2.

A gátóanyagok (8) mennyiségi meghatározásához készítsünk gátóanyag-mentes tejben standard penicillin oldatokat (A.5.3) a következő koncentrációkkal:

- (a) 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (0,0067 IU/ml)
- (b) 0,006 $\mu\text{g/ml}$ (0,01 IU/ml)
- (c) 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (0,05 IU/ml)
- (d) 0,06 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 IU/ml)

5.3. Penicillináz oldat

5.3.1. Oldjunk fel annyi penicillinázt (béta-laktamázt) steril, desztillált vízben, hogy 1000 U/ml koncentrációt kapjunk. Ezt az oldatot, lehetőleg kis adagokra szétosztva, legfeljebb négy hétig 0-tól 5 °C -on lehet tárolni.

Megjegyzés:

Nincs egyöntetű nemzetközi standard a penicillinázra. Ezen eljárás céljából feltételezzük, hogy 10 egység penicillináz elegendő $0,6\text{ }\mu\text{g}$ (= 1 IU) penicillin inaktiválásához. Ismeretlen aktivitású penicillináz tétel esetén ellenőrizni kell, hogy ez a feltételezés érvényes-e. Ellenkező esetben megfelelően be kell állítani a penicillináz oldat koncentrációját.

5.3.2. Penicillináz oldat helyett, a kereskedelemben kapható penicillinázzal átitatott korongokat is lehet használni, kontroll eljárás után megállapítható, hogy a kívánt penicillináz mennyiséget tartalmazzák-e.

5.4. *Teszt organizmus*

Lásd A.5.4.

5.5. *Teszt kultúra (spóra szuszpenzió)*

Lásd A.5.5.

5.6. *A teszt csészék elkészítése*

5.6.1. Olvasszuk fel a gátlóanyagok (5.1.2) kimutatására szolgáló teszt táptalajt, és hűtsük le 55 °C-ra.

5.6.2. Adjunk egy üvegben egy rész friss spóra szuszpenziót (5.5) annyi rész, gátlóanyagok kimutatására szolgáló, teszt táptalajhoz (5.1.2), hogy az így beoltott teszt táptalajban majd megfelelő legyen a telepsűrűség. Alaposan keverjük össze az anyagot.

5.6.3. Vigyünk át a beoltott teszt táptalajból annyit (5.6.2), egy előzőleg 55 °C-ra felmelegített steril Petri-csészébe (A.4.2.2), hogy így 0,6 - 0,8 mm vastag réteget kapjunk. Egy 140 mm belső átmérőjű Petri-csésze használatkor rendszerint kb. 15 ml teszt táptalaj szükséges a 0,8 mm vastagság eléréséhez.

5.6.4. Helyezzük a Petri-csészéket hideg, vízszintes felületre, amelyet előzőleg vízszintmérővel ellenőriztünk, vegyük le a fedeleket, és hagyjuk megszilárdulni az agar táptalajt. Amikor megszilárdult, tegyük vissza a fedeleket a csészékre, és fordítsuk meg a csészéket, hogy az agar táptalaj felületén a páralecsapódást minimálisra csökkentsük.

5.6.5. Az így elkészített teszt csészéket lehetőleg még aznap használjuk fel, de két hétig eltarthatók, ha közvetlenül az elkészítés után lezárt polietilén zacskóban 5 °C-on tároljuk.

5.6.6. A minták azonosítása céljából a teszt csészék alját jelöljük meg.

6. **Eljárás**

6.1. *A minta elkészítése*

6.1.1. Az 'A módszerrel' (A.7.1 és A.7.2) a pozitív vagy kétes eredményeket adó mintákat újra kell vizsgálni, azonosítani, és a penicillint mennyiségileg meg kell határozni.

6.1.2. Először ezeket a mintákat 80 ± 1 °C-on 10 percig melegítjük, hogy a termolabilis nem-specifikus gátlóanyagok hatását elkerüljük.

6.1.3. Alapos keverés után, kb. 10 ml felmelegített tejmintát egy megfelelően steril, széles szájú üvegbe mérünk. Körülbelül 0,4 ml penicillináz oldatot (5.3) adunk a tejhez és alaposan elkeverjük.

6.2. *Gátlóanyagok kimutatása*

6.2.1. Mártunk papír korongot (4.3) a tejmintába (6.1.2) tiszta, száraz csipesz segítségével. Távolítsuk el a felesleges tejet úgy, hogy a korongot a mintát tartalmazó üveg oldalához érintjük. Fekessük el a korongot a teszt csésze felületén (5.6) és finoman nyomjuk le a csipesszel.

6.2.2. A különböző tejmintákkal elkészített korongoknak legalább 20 mm-re kell elhelyezkedniük egymástól és legalább 10 mm-re a csésze szélétől.

6.2.3. Az érzékenység ellenőrzése céljából (4.3) a standard penicillin oldatba (5.2) mártott korongokat véletlenszerűen a tejmintát tartalmazó korongok közé kell helyezni úgy, hogy a számuk a tejmintát tartalmazó korongok számának legalább 2%-át kitegye, és legalább öt standard korongot használjunk minden vizsgálat során.

- 6.2.4. Amikor az összes korongot véletlenszerű elrendezésben az agar táptalajra helyeztük és azokat megjelöltük, fordítsuk meg a csészéket és inkubáljuk 63 ± 1 °C-on, 2,5 órától 5 óra hosszáig terjedő ideig.
- 6.2.5. Inkubáció után a csészéket megfelelő fényforrás előtt megvizsgáljuk, hogy megállapítsuk a papír korongok körül a feltisztult gátlási zónákat és azok méretét.
- 6.2.6. A standard penicillin oldatot tartalmazó korongok (6.2.3) körül található zónák mérete legalább 2 mm kell legyen.
- 6.2.7. Ha a tejmintát tartalmazó korongok körül található feltisztult zónák legalább ugyanolyan méretűek vagy a nagyobbak, mint a 6.2.6-ban leírtaknál, ez a teszt baktériumra gátló hatású anyag jelenlétét mutatja.

6.3. A gátlóanyagok azonosítása és mennyiségi meghatározása.

- 6.3.1. A 6.2.1 eljárást ugyanúgy elvégezzük a melegített tejmintán (6.1.2) és a penicillinázzal kezelt mintán (6.1.3). A penicillináz 10 ml tejmintához adása helyett készen kapható penicillináz korongot (5.3.2) is belemárthatunk a mintába és azt helyezzük a tesztcsészére.
- 6.3.2. A 6.2.1 eljárást ugyanúgy elvégezzük minden egyes 5.2.(a)-(d)-ben említett standard penicillin oldattal.
- 6.3.3. Meg kell határozni a feltisztult gátlási zónák átlagos átmérőjét a tejmintára és a penicillináz kontrollra, valamint a standard penicillin oldatokra vonatkozóan.

7. Az eredmények értelmezése (lásd 2)

7.1. *Ha a penicillináz kontrollt tartalmazó korong körül nincs feltisztult zóna, de a tejmintát tartalmazó korong körül van feltisztulás, amely ugyanolyan nagyságú vagy nagyobb, mint a standard penicillin oldatot tartalmazó (5.2(a)) korong körüli zóna, akkor a tejmintában található gátlóanyag mennyisége legalább 0,004 µg/ml nátrium-(kálium)-benzil-penicillin koncentrációnak felel meg.*

7.2. *Ha a penicillinázt tartalmazó korong körül található feltisztult zóna átlagos átmérője megegyezik a tejmintát tartalmazó korong körül található feltisztult zóna átlagos átmérőjével, akkor a tej olyan gátlóanyagokat tartalmaz, amelyeket a jelen eljárásban használt penicillináz koncentrációval nem lehet inaktíválni.*

7.3. *Ha a penicillinázt tartalmazó korong körül található feltisztult zóna átlagos átmérője kisebb, mint a 6.1.2-ben leírt módon melegített tejmintát tartalmazó korong körül található feltisztult zóna átlagos átmérője, a tejminta a penicillin mellett egyéb antibiotikumokat, köztük szulfonamidokat is tartalmaz, vagy felszintetikus penicillint, amelyet a jelen eljárásban használt penicillináz koncentrációval nem lehet meghatározni. A szintetikus penicillineket, mint pl. a nátrium-cloxacillint nem feltétlenül lehet inaktíválni a vizsgálatban használt penicillinázzal, ezért egyéb gátlóanyagoknak és nem penicillinnek minősítjük.*

Megjegyzés:

A nem-penicillin gátlóanyagokat szükség esetén megfelelő eljárással kell meghatározni.

8. A penicillin tartalom meghatározása

8.1. *A penicillin tartalom meghatározása vagy a kalibrációs görbe megrajzolásával, vagy a tejjel készült standard penicillin oldatokkal végzett vizsgálat során kapott zónák méretéből végzett számításokkal. (5.2 (a)-(d)) történhet.*

8.2. A kalibrációs görbe megrajzolása

Mivel egyenes arány van a penicillin koncentráció 10-es alapú logaritmusával és a gátlási zónák átmérője között, a kalibrációs görbét fél-logaritmikus papíron meg lehet rajzolni, ahol a penicillin koncentrációk értékeinek 10-es alapú logaritmusait az ordinátán vesszük fel, a gátlási zónák méreteit pedig az abszcisszán.

A gátlási zónák méretét a párhuzamos vizsgálatok átlagaként vesszük figyelembe. A gátlási zónák átmérőjét ábrázoljuk a standard penicillin koncentrációk függvényében, és így megkapjuk a standard görbét.

8.3. Számítás

A tejmintában lévő penicillin koncentrációt a zóna átmérőkből lehet kiszámítani, egyenlet vagy kalibrációs görbe segítségével. A pontos meghatározáshoz a gátlási zónák sugarának nagyobbak kell lenni, mint a korongok sugarának, legalább kétszer, de legfeljebb ötször.

9. Az eredmények megadása

9.1. *Az eredményeket 0,004 µg/ml vagy e feletti penicillin tartalomként adjuk meg (vagy jelezzük a meghatározott koncentrációt), vagy nem-penicillin gátlóanyag tartalomként.*

9.2. *Ismételhetőség (r) és reprodukálhatóság (R)*

Az adatok nem állnak rendelkezésre és nem hasznosíthatók, mert az összehasonlításhoz standardot is használnak.

IX. PATOGÉN MIKROORGANIZMUSOK KIMUTATÁSA

1. Alkalmazási kör és terület

A 85/397/EGK irányelv A Függelék, VII. Fejezet (2) előírásaival összhangban ez az eljárás megadja azokat az utasításokat, melyeket a pasztörözött tej patogén mikroorganizmusokra irányuló vizsgálatokor be kell tartani.

2. Definíció

A vizsgálat azoknak a baktériumfajoknak a kimutatására irányul, amelyek leggyakrabban okoznak élelmiszer eredetű megbetegedéseket.

A pasztörözés olyan kezelés, amely megvédi a tejben előforduló, nem hőrezisztens patogénektől szemben. Amennyiben a Direktíva A Függelék VII (2) fejezetében foglalt szabvány követelményeket betartják a 30 °C és 21 °C -on meghatározott telepszámra és a koliform számra, valamint a foszfátzra vonatkozóan, a patogének specifikus kimutatása csak akkor szükséges, ha annak gyanúja merül fel, hogy a tej ételmérgezéssel hozható kapcsolatba.

3. Eljárás

A vizsgálat eljárásait és gyakoriságát a nemzeti hatóság szabja meg olyan módon, hogy a Közösségen belüli kereskedelmi forgalomban lévő hőkezelt tejre Egészségügyi igazolást lehessen kiállítani. A patogén mikroorganizmusok kimutatására vonatkozólag a nemzetközileg elfogadott követelményeket és eljárásokat kell alkalmazni, amennyiben rendelkezésre állnak.

4. Vizsgálati jelentés

Valamennyi vizsgált patogén mikroorganizmusnál az eredményt a következőképpen kell megadni:

Szám/ml tej vagy 'jelenlét' vagy 'hiány' az adott eljárásához előírt pasztörözött tej térfogatban. A jelentésnek egyértelműen le kell írni az alkalmazott eljárást. Az anti-folát anyagokat tartalmazó táptalajra vonatkozó szabadalmi joggal kapcsolatos előírásokat be kell tartani.

– *VÉGE* –