

---

---

**Молоко и молочные продукты  
Определение минимальной  
подавляющей концентрации (MIC)  
антибиотиков, применяемым к  
бифидобактериям (LAB)**

*iTeh STA* *Milk and milk products – Determination of the minimal inhibitory  
concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria (LAB)*  
(standards.iteh.ai)

ISO 10932:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11131846-281c-46a2-8678-d21bfa15bb46/iso-10932-2010>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава



Ссылочные номера  
ISO 10932:2010(R)  
IDF 223:2010(R)

**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 10932:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11131846-281c-46a2-8678-d21bfa15bb46/iso-10932-2010>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO и IDF 2010

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без разрешения в письменной форме от ISO или IDF, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

International Dairy Federation  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Brussels  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
Введение .....	vi
1 Область применения .....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Термины и определения .....	2
4 Сущность метода .....	2
5 Разбавители, питательные среды и реактивы .....	2
5.1 Основные материалы .....	2
5.2 Разбавители .....	2
5.3 Питательные среды .....	3
6 Аппаратура и стеклянная лабораторная посуда .....	12
7 Отбор проб .....	13
8 Проведение испытания .....	13
8.1 Выращивание .....	13
8.2 Штаммы для контроля качества и испытания .....	14
8.3 Условия выращивания бактерий для анализа на восприимчивость к антибиотикам .....	14
8.4 Подготовка планшета для микро-разведений .....	15
9 Обработка результатов .....	19
10 Прецизионность .....	19
10.1 Межлабораторные испытания .....	19
10.2 Повторяемость (сходимость) .....	20
10.3 Воспроизводимость .....	20
11 Протокол испытания .....	20
Приложение А (информативное) Межлабораторные испытания .....	21
Библиография .....	32

## Предисловие

**Международная организация по стандартизации (ISO)** является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Для опубликования их в качестве международного стандарта требуется одобрение не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует учитывать возможность того, что некоторые элементы настоящего документа могут быть предметом патентного права. ISO не несет ответственности за идентификацию любого из таких патентных прав.

ISO 10932|IDF 223 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Публикуется совместно ISO и IDF.

[ISO 10932:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11131846-281c-46a2-8678-d21bfa15bb46/iso-10932-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11131846-281c-46a2-8678-d21bfa15bb46/iso-10932-2010>

## Предисловие

**Международная Молочная Федерация (IDF)** является некоммерческой организацией, представляющей всемирное молочное животноводство. Членами IDF являются Национальные комитеты каждой страны-члена, а также региональные ассоциации по молочному животноводству, которые имеют подписанное официальное соглашение о совместной деятельности с IDF. Каждый член IDF имеет право быть представленным в Постоянных комитетах IDF, осуществляющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO по вопросам разработки стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Основная задача Постоянных комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Постоянными комитетами, рассылаются Национальным комитетам для утверждения до опубликования в качестве международных стандартов. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50 % Национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. IDF не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 10932|IDF 223 был подготовлен Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Публикуется совместно IDF и ISO.

Вся работа была выполнена объединенной Рабочей группой ISO-IDF по *Минимальной подавляющей концентрации (MIC) антибиотиков* Постоянного комитета по *Методам анализа молочнокислых микроорганизмов* под руководством, г-на. М. Даниэльсона (Дания).

(standards.iteh.ai)

ISO 10932:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11131846-281c-46a2-8678-d21bfa15bb46/iso-10932-2010>

## Введение

Опубликовано несколько отчетов по определению различными методами минимальной дозы ингибитора (MIC) молочнокислых бактерий. Однако, полученное значение MIC зависит от использованного определения и техники выращивания штамма. Например, MIC, определенная различными количественными методами, не всегда одинакова. Также некоторые компоненты сред являются антагонистичными к определенным антибиотикам.

Следовательно, необходимо стандартизованное определение MIC, в котором используется подходящая питательная среда, имеющая незначительное антагонистическое воздействие или совсем не имеющая такого воздействия в отношении изучаемых антибиотиков.

Два проекта ЕС (PROSAFE и ACE-ART) были запущены для решения этой проблемы, были предложены подходящие питательные среды и метод измерения MIC. Настоящий международный стандарта основан на стандартной рабочей методике (SOP), предложенной в проекте ACE-ART.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 10932:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11131846-281e-46a2-8678-d21bfa15bb46/iso-10932-2010>

# Молоко и молочные продукты Определение минимальной подавляющей концентрации (MIC) антибиотиков, применяемым к бифидобактериям (LAB)

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** — Антибиотики являются веществами, которые могут быть опасными. Следует принять определенные меры, чтобы избежать контакта с этими веществами. В частности, канамицин может причинить вред нерожденному ребенку (фраза риска R61) хлорамфеникол может вызвать раковые заболевания (фраза риска R45).

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод определения минимальной подавляющей концентрации (MIC) серии антибиотиков применительно к бифидобактериям и молочнокислым бактериям (LAB), исключая энтерококки.

**ПРИМЕЧАНИЕ** В отличие от диско-диффузионного метода, который является полуколичественным, часто используемый метод микро-разведений бульона дает количественные MIC испытуемого микроорганизма в серии разбавления антибиотиков. Наименьшая концентрация антибиотика, которая предотвращает видимый рост испытуемого организма, считается минимальной подавляющей концентрацией (MIC).

Настоящий международный стандарт рекомендует метод микро-разведений бульона в качестве стандартного метода.

## 2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы обязательны для применения данного документа. Для датированных ссылок применяется только указанное издание. Для недатированных ссылок применяется самое последнее издание указанного документа (включая все изменения).

ISO 6887-5, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 5. Специальные правила для приготовления молока и молочных продуктов*

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

ISO/TS 11133-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории*

ISO/TS 11133-2, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий *Сampylobacter spp.* Часть 2. Метод подсчета колоний*

### 3 Термины и определения

Применительно к данному документу используются следующие термины и определения.

**3.1**  
**минимальная подавляющая концентрация**  
**minimal inhibitory concentration**  
**MIC**  
Самая низкая концентрация, определенная в условиях *in vitro*, предупреждает видимый рост бактерий в рамках определенного периода времени

[ISO 20776-1:2006<sup>[6]</sup>, 2.4]

ПРИМЕЧАНИЕ MIC выражается в микрограммах на миллилитр.

### 4 Сущность метода

Большинство отдельных колоний, выращенных на чашке с агаровой средой, собирают и суспендируют в стерильном физиологическом растворе, а бактерии *Bifidobacterium* spp. помещают в предварительно восстановленную среду LSM-Cys.

Бактериальную суспензию разбавляют рекомендованной средой.

Готовят планшет для микро-разведений с серией двукратных разведений антибиотика.

Разбавленную бактериальную суспензию распределяют по лункам планшета и инкубируют в рекомендованных условиях.

Самая низкая концентрация антибиотика, которая предотвращает видимый рост бактерий, считается минимальной подавляющей концентрацией (MIC).

### 5 Разбавители, питательные среды и реактивы

#### 5.1 Основные материалы

Используют только реактивы признанной аналитической чистоты, если нет иных указаний, и стерильную дистиллированную или деминерализованную воду или воду равноценной чистоты. См. ISO 6887-5.

#### 5.2 Разбавители

См. ISO 6887-5.



### 5.3 Питательные среды

#### 5.3.1 Агар MRS

##### 5.3.1.1 Состав

Пептон 1 (триптический гидролизат казеина)	10,0 г
Мясной экстракт	10,0 г
Дрожжевой экстракт (высушенный)	5,0 г
Глюкоза	20,0 г
Полисорбат 80 (полиэтокселированный сорбитанмоноолеат) <sup>a</sup>	1,0 мл
Гидрофосфат калия (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,0 г
Тригидрат ацетата натрия (NaCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	5,0 г
Цинтрат аммония [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ]	2,0 г
Гептагидрат сульфата магния (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,2 г
Тетрагидрат сульфата марганца (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0,05 г
Агар	от 10 г до 15 г <sup>b</sup>
Доводят водой до	1 000 мл

<sup>a</sup> Твееп 80 является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ISO или IDF в отношении данной продукции.

<sup>b</sup> В зависимости от прочности агарового геля.

<sup>c</sup> При использовании планшетов для микро-разведения, изготовленных вручную (8.4.5.1), среду MRS следует приготовить при концентрации вдвое выше посредством доведения водой до 500 мл.

##### 5.3.1.2 Приготовление

Суспендируют ингредиенты в воде. Нагревают суспензию до кипения при частом перемешивании до полного растворения. При необходимости регулируют pH (6.7) до  $6,35 \pm 0,2$  разбавленной соляной кислотой или разбавленным гидроксидом натрия перед автоклавированием. После обработки в автоклаве, диапазон pH агаровой среды MRS должна быть  $6,2 \pm 0,2$  при температуре 25 °C. Разливают среду порциями объемом 100 мл  $\pm$  1 мл в склянки (6.8) вместимостью 150 мл или порциями объемом 200 мл  $\pm$  2 мл в склянки (6.8) вместимостью 250 мл.

Стерилизуют в автоклаве (6.5), который поддерживается при температуре 121 °C, в течение 15 мин. Если среду предполагается использовать немедленно, охлаждают ее на водяной бане (6.6) до температуры от 44 °C до 47 °C. Если среда не будет использоваться немедленно, плавят агар MRS (5.3.1.1) на кипящей водяной бане (6.6) и тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков, затем охлаждают на водяной бане (6.6) до температуры от 44 °C до 47 °C.

Разливают от 15 мл до 20 мл приготовленной среды в чашки Петри (6.10). Дают среде охладиться. Для застывания среды чашки Петри с крышками помещают на прохладную горизонтальную поверхность.

Перед применением сушат агаровую среду в соответствии с ISO/TS 11133-1.

Приготовленные чашки с агаром MRS можно хранить в воздухонепроницаемом пластиковом пакете в темном месте при температуре от 2 °C до 8 °C в течение 2 недель.

Чашки с агаровой средой анализируют на загрязнение микроорганизмами в соответствии с ISO/TS 11133-2.

Полная агаровая питательная среда MRS (концентрат) имеется в продаже, однако полученные результаты могут значительно отличаться при использовании сред от разных поставщиков. Поэтому при использовании готовой среды необходимо проверить агар MRS по такой же среде, приготовленной в соответствии с настоящим международным стандартом.

### **5.3.2 MRS-цистеиновый агар (агар MRS-Cys)**

Агар MRS-Cys включает агар MRS (5.3.1) с добавлением 0,3 г L-цистеина на литр среды.

#### **5.3.2.1 Основная среда — агар MRS**

См. 5.3.1.

#### **5.3.2.2 Исходный раствор L-цистеина**

##### **5.3.2.2.1 Состав**

L-цистеина гидрохлорид	0,3 г
Доводят водой до	10,0 мл

##### **5.3.2.2.2 Приготовление**

Растворяют L-цистеина гидрохлорид в воде. Стерилизуют пропусканием через фильтр 0,2 мкм (6.12) в стерильную пробирку (6.13).

Исходный раствор L-цистеина можно хранить в темном месте при температуре от 2 °C до 8 °C в течение до 1 недели. Не допускается воздействие прямого солнечного света.

#### **5.3.2.3 Полная среда**

##### **5.3.2.3.1 Состав**

Основная среда (5.3.1)	100 мл
Исходный раствор L-цистеина (5.3.2.2)	1,0 мл

##### **5.3.2.3.2 Приготовление**

Непосредственно перед применением плавят агар MRS (5.3.1) на кипящей водяной бане (6.6). Охлаждают на водяной бане (6.6), поддерживаемой при температуре от 44 °C до 47 °C.

Соблюдая правила асептики добавляют 1,0 мл исходного раствора L-цистеина (5.3.2.2) в 100 мл агара MRS (5.3.1). Тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков газа.

Разливают в чашки Петри (6.10) по 15 мл - 20 мл приготовленной среды. Дают среде охладиться. Для застывания агара помещают чашки Петри со средой с крышками на прохладную горизонтальную поверхность. Перед применением сушат поверхность агара в соответствии с ISO/TS 11133-1.

Подготовленные чашки с агаровой средой MRS-Cys можно хранить в воздухонепроницаемом пластиковом пакете в темном месте при температуре от 2 °C до 8 °C до 1 недели.

Анализируют чашки со средой на загрязнение микроорганизмами в соответствии с ISO/TS 11133-2.

Полная агаровая среда MRS-Cys имеется в продаже, однако полученные результаты могут значительно отличаться при использовании сред от разных поставщиков. Поэтому при использовании готовой среды необходимо проверить агар MRS-Cys по такой же среде, приготовленной в соответствии с настоящим международным стандартом.

### 5.3.3 Агар M17-сахароза

Агар M17-сахароза включает агар M17 (5.3.3.1) с добавлением 5,0 г сахарозы на литр среды.

#### 5.3.3.1 Основная среда — агар M17

##### 5.3.3.1.1 Состав

ТТриптон (панкреатический гидролизат казеина)	5,0 г
Соевый пептон	5,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Дрожжевой экстракт (высушенный)	2,5 г
Аскорбиновая кислота (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	0,5 г
Гектагидрат сульфата магния (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,25 г
Глицерофосфат натрия (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> PO <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	19,0 г
Агар	10 г - 15 г <sup>a</sup>
Доводят водой до	950 мл
<sup>a</sup> В зависимости от прочности агарового геля.	

##### 5.3.3.1.2 Приготовление

Суспендируют ингредиенты в воде. Нагревают суспензию до кипения при частом перемешивании до полного растворения. При необходимости регулируют pH (6.7) до  $7,35 \pm 0,2$  разбавленной соляной кислотой или разбавленным гидроксидом натрия перед автоклавированием. После обработки в автоклаве, диапазон pH агаровой среды M17 должна быть  $7,2 \pm 0,2$  при температуре 25 °C. Разливают среду порциями объемом 95 мл  $\pm$  1 мл в склянки (6.8) вместимостью 150 мл или порциями объемом 190 мл  $\pm$  2 мл в склянки (6.8) вместимостью 250 мл.

Стерилизуют в автоклаве (6.5), который поддерживается при температуре 121 °C, в течение 15 мин. Если среду предполагается использовать немедленно, охлаждают ее на водяной бане (6.6) до температуры от 44 °C до 47 °C. Если среда не будет использоваться немедленно, плавят агар M17 (5.3.3.1) на кипящей водяной бане (6.6) и тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков газа, затем охлаждают на водяной бане (6.6) до температуры от 44 °C до 47 °C

#### 5.3.3.2 Исходный раствор сахарозы

##### 5.3.3.2.1 Состав

Сахароза	5,0 г
Доводят водой до	50 мл

### 5.3.3.2.2 Приготовление

Растворяют сахарозу в воде. Стерилизуют пропусканием через фильтр 0,2 мкм (6.12) в стерильную пробирку (6.13).

### 5.3.3.3 Полная среда

#### 5.3.3.3.1 Состав

Основная среда (5.3.3.1)	95,0 мл
Исходный раствор сахарозы (5.3.3.2)	5,0 мл

#### 5.3.3.3.2 Приготовление

Непосредственно перед применением плавят агар М17 (5.3.3.1) на кипящей водяной бане (6.6). Охлаждают на водяной бане (6.6), поддерживаемой при температуре от 44 °С до 47 °С.

Соблюдая правила асептики добавляют 5,0 мл исходного раствора сахарозы (5.3.3.2) в 95,0 мл агара М17 (5.3.3.1). Тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков газа.

Разливают в чашки Петри (6.10) по 15 мл - 20 мл приготовленной среды. Дают среде охладиться. Для застывания агара помещают чашки Петри со средой с крышками на прохладную горизонтальную поверхность.

Перед применением сушат поверхность агара в соответствии с ISO/TS 11133-1.

Подготовленные чашки со средой агар М17-сахароза можно хранить в воздухонепроницаемом пластиковом пакете в темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С до 2 недель.

Анализируют чашки со средой на загрязнение микроорганизмами в соответствии с ISO/TS 11133-2.

### 5.3.4 Агар М17-лактоза

Агар М17-лактоза включает агар М17 (5.3.3.1) с добавлением 5,0 г лактозы на литр среды.

#### 5.3.4.1 Основная среда — агар М17

См. 5.3.3.1.

#### 5.3.4.2 Исходный раствор лактозы

##### 5.3.4.2.1 Состав

лактоза	5,0 г
Доводят водой до	50 мл

##### 5.3.4.2.2 Приготовление

Растворяют лактозу в воде. Стерилизуют пропусканием через фильтр 0,2 мкм (6.12) в стерильную пробирку (6.13).

### 5.3.4.3 Полная среда

#### 5.3.4.3.1 Состав

Основная среда (5.3.3.1)	95,0 мл
Исходный раствор лактозы (5.3.4.2)	5,0 мл

#### 5.3.4.3.2 Приготовление

Непосредственно перед применением плавят агар М17 (5.3.3.1) на кипящей водяной бане (6.6). Охлаждают на водяной бане (6.6), поддерживаемой при температуре от 44 °С до 47 °С.

Соблюдая правила асептики добавляют 5,0 мл исходного раствора лактозы (5.3.4.2) в 95,0 мл агара М17 (5.3.3.1). Тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков газа.

Разливают в чашки Петри (6.10) по 15 мл - 20 мл приготовленной среды. Дают среде охладиться. Для застывания агара помещают чашки Петри со средой с крышками на прохладную горизонтальную поверхность.

Перед применением сушат поверхность агара в соответствии с ISO/TS 11133-1.

Подготовленные чашки со средой агар М17-лактоза можно хранить в воздухонепроницаемом пластиковом пакете в темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С до 2 недель.

Анализируют чашки со средой на загрязнение микроорганизмами в соответствии с ISO/TS 11133-2.

### 5.3.5 Агар Элликера (Elliker)

#### 5.3.5.1 Состав

Панкреатический гидролизат казеина	20,0 г
Дрожжевой экстракт (высушенный)	5,0 г
Желатин	2,5 г
Декстроза	5,0 г
лактоза	5,0 г
Сахароза	5,0 г
Хлорид натрия (NaCl)	4,0 г
Тригидрат ацетата натрия (Na CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	1,5 г
Ас корбиновая кислота (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	0,5 г
Агар	10 г - 15 г <sup>а</sup>
Доводят водой до	1 000 мл
<sup>а</sup> В зависимости от прочности агарового геля.	