

Suvestinė redakcija nuo 2006-08-04

Įsakymas paskelbtas: Žin. 2001, Nr. [40-1406](#), i. k. 1012330ISAK00000146

LIETUVOS RESPUBLIKOS ŽEMĖS ŪKIO MINISTRAS

**Į S A K Y M A S
DĖL PIENO SUPIRKIMO TAISYKLIŲ PATVIRTINIMO**

2001 m. gegužės 9 d. Nr. 146

Vilnius

Pakeistas teisės akto pavadinimas:

Nr. [3D-245](#), 2003-06-20, Žin., 2003, Nr. 60-2739 (2003-06-25), i. k. 1032330ISAK003D-245

Atsižvelgdamas į Europos Sąjungos ekspertų komisijos išvadą, įvertindamas Pieno gamintojų asociacijos narių suvažiavimo bei pieno gamintojų, perdirbėjų ir mokslo įstaigų pasiūlymus,

1. T v i r t i n u naujos redakcijos Pieno supirkimo taisyklės (pridedama).
2. N u s t a t a u , kad Pieno supirkimo taisyklės įsigalioja 2001 m. birželio 1 d.
3. L a i k a u netekusiu galios 1999 04 26 žemės ūkio ministro įsakymą Nr. 173 „Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo“ (Žin., 1999, Nr. [38-1180](#)) nuo 2001 m. birželio 1 d.

ŽEMĖS ŪKIO MINISTRAS

KĘSTUTIS KRISTINAITIS

PATVIRTINTA

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro
2001 m. gegužės 9 d. įsakymu Nr. 146
(Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro
2005 m. lapkričio 11 d. įsakymo Nr. 3D-527
redakcija)

PIENO SUPIRKIMO T A I S Y K L Ė S

I. BENDROSIOS NUOSTATOS

1. Šiomis taisyklėmis nustatoma pieno pirkimo, sudėties bei kokybės vertinimo ir atsiskaitymo tvarka superkant iš pieno gamintojų žalią pieną.

2. Iš pieno gamintojų superkamo pieno sudėtis ir kokybė vertinama vadovaujantis 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos Reglamentu (EB) Nr. 853/2004, nustatančiu konkrečius gyvūninės kilmės maisto produktų higienos reikalavimus, ir šiomis taisyklėmis.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, *Žin.*, 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

3. Pagrindinės šiose taisyklėse vartojamos sąvokos:

Pieno gamintojas (toliau – gamintojas) – fizinis ir juridinis asmuo, gaminantis pieną parduoti.

Pieno supirkėjas (toliau – supirkėjas) – juridinis asmuo, Lietuvos Respublikos teisės aktų nustatyta tvarka perkantis pieną iš pieno gamintojų savo ūkinei veiklai ir nustatyta tvarka patvirtintas Nacionalinės mokėjimo agentūros prie Žemės ūkio ministerijos.

Pieno siunta – vienu metu iš vieno gamintojo nupirktas pienas.

Igaliotoji laboratorija (toliau – laboratorija) – nešališka akredituotoji tyrimų laboratorija, kurią Žemės ūkio ministerija įgalioja tirti pieno mėginius, siekdama nustatyti jo sudėtis ir kokybės rodiklius, pagal kuriuos supirkėjai apmoka gamintojams už parduotą pieną. Jos veikla kontroliuojama Lietuvos Respublikos teisės aktų nustatyta tvarka.

Žalias karvių pienas – natūralus karvių pienas, kuris nebuvo pašildytas iki aukštesnės kaip 40 °C temperatūros ir neapdorotas kitu tos pat vertės efektyvumo metodu, be priedų, nepakeistos pirminės sudėties (riebalų kiekis 2–7 proc., baltymų kiekis 2–5 proc., laktozės kiekis 3–6 proc.).

Pirminiai pieno kokybės rodikliai – pieno spalva, kvapas, konsistencija, temperatūra, skonis, rūgštingumas, švarumas, tankis, neutralizuojančios ir inhibitorinės (slopinančiosios) medžiagos.

Pieno sudėties rodikliai – riebalų ir baltymų kiekis piene procentais.

Pieno kokybės rodikliai – bendras bakterinis užterštumas tūkst./cm³, somatinių ląstelių skaičius tūkst./cm³, inhibitorinės (slopinančiosios) medžiagos ir pieno užšalimo temperatūra °C.

Vienkartinis pieno mėginys – iš bet kurios pieno siuntos ar bendros pieno supirkimo punkto talpyklos paimtas pieno mėginys, į kurį įdedama arba nededama konservanto.

Kontrolinis mėginys – specialiai sudarytos komisijos (jos nariai turi būti supirkėjo, gamintojo, kontroliuojančios valstybės institucijos atstovai) imamas pieno mėginys.

Privalomieji pieno tyrimai – riebalų, baltymų, somatinių ląstelių tyrimas 3 kartus per mėnesį, ne rečiau kaip po vieną tyrimą laikotarpiais: nuo 1 iki 15 d. ir nuo 16 iki 31 d. bakterinio užterštumo, inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų – 2 kartus per mėnesį po vieną tyrimą laikotarpiais: nuo 1 iki 15 d. ir nuo 16 iki 31 d., pieno užšalimo temperatūros – kartą per pusmetį.

Papildomieji pieno tyrimai – gamintojo, supirkėjo ir kontroliuojančios valstybės institucijos iniciatyva atliekami pieno tyrimai.

Išskaitinis tiekimo laikotarpis – pastovios trukmės: 1–15 ir 16–31 mėnesio dienų arba šalių susitarimu, bet ne ilgesnis kaip vieno mėnesio laikotarpis, kai nustatomi pieno sudėties ir kokybės rodikliai.

Kontroliuojančios valstybės institucijos – Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba (toliau – VMVT), kitos įgaliotos valstybės institucijos.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, *Žin.*, 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

4. Pienas superkamas tik sudarius su gamintoju rašytinę pieno pirkimo–pardavimo sutartį, kuri turi atitikti Atsiskaitymo už žemės ūkio produkciją įstatymo (*Žin.*, 1999, Nr. [102-2921](#)) ir Tipinių pieno pirkimo–pardavimo sutarties sąlygų, patvirtintų Lietuvos Respublikos Vyriausybės 2003 m. birželio 4 d. nutarimu Nr. 726 (*Žin.*, 2003, Nr. [56-2493](#)), reikalavimus.

5. Supirkėjas privalo supažindinti gamintoją, o gamintojas susipažinti su 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos Reglamentu (EB) Nr. 853/2004, šiomis taisyklėmis, Lietuvos Respublikos Vyriausybės 2003 m. birželio 4 d. nutarimu Nr. 726. Šie norminiai dokumentai turi būti supirkimo vietose. Supirkėjas teikia informaciją gamintojams aktualiais pieno kokybės ir supirkimo tvarkos bei pieno gamybos kvotų sistemos klausimais.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, *Žin.*, 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

6. Gamintojas, pradėdamas tiekti pieną parduoti (t. y. gamintojas, anksčiau nepardavinėjęs pieno arba jo pardavimą nutraukęs ilgiau kaip 2 mėnesius, arba pradėjęs tiekti pieną į kitą supirkimo įmonę), privalo kreiptis į supirkėją dėl pieno mėginių visiems privalomiesiems (pagal šių taisyklių 11 ir 13 punktus) pieno sudėties ir kokybės rodikliams nustatyti paėmimo iš pirmos pristatytos pardavimui pieno siuntos. Jeigu pieno ūkis naujai registruotas, t. y. anksčiau nebuvo tikrintas, pieno gamintojas, prieš pradėdamas tiekti pieną parduoti, turi atlikti procedūras, nurodytas Pieno supirkimo tvarkos apraše, patvirtintame Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2006 m. birželio 27 d. įsakymu Nr. B1-401 (toliau – VMVT Aprašas) (*Žin.*, 2006, Nr. [73-2810](#)).

Supirkėjas, prieš pradėdamas pirkti pieną iš pradedančio tiekti pieną gamintojo, privalo VĮ „Pieno tyrimai“ duomenų bazėje patikrinti, ar šiam gamintojui nebuvo nutrauktas pieno supirkimas pagal šių taisyklių 14 ir 18 punktus. Pieną supirkti galima tik atnaujinus pieno supirkimą, kaip nurodyta šių taisyklių 19 punkte. Jeigu pieno supirkimas buvo nutrauktas 15 kalendorinių dienų dėl inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, pieną supirkti galima tik praėjus nustatytam terminui, jeigu nėra kitokio VMVT sprendimo, kaip nurodyta šių taisyklių 18 punkte.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, *Žin.*, 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

7. Pienas superkamas pagal iš anksto supirkėjo nustatytą ir paskelbtą grafiką. Supirkimo laikas turi būti įrašytas į pieno supirkimo ir priskaitymo knygelę.

Pieno supirkimo punktai privalo žalią pieną supirkti dažniau kaip kartą per dieną, jeigu apskaičiuojama, kad superkamo pieno kiekis bus pakankamas šaldytuvo maišyklei įjungti pieno atšaldymui iki reikiamos temperatūros.

8. Pienas sveriamas arba matuojamas jo tūris, perskaičiuojant jį į masę pagal faktinį tankį arba naudojant perskaičiavimo (dauginimo) koeficientą 1,028. Kai pieno nedaug, matuojant pieno tūrį matuokliais arba sveriant pieną, matavimo tikslumas turi būti ne mažesnis kaip 0,1 litro (0,1 kg).

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, *Žin.*, 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

9. Pieno supirkimo metu supirkėjo pasirinktomis dienomis imami mėginiai pieno sudėčiai ir kokybei tirti. Mėginiai atrenkami ir konteineriai plombuojami 1 priede nurodyta tvarka.

10. Apmokėjimo už pieno tyrimus tvarką ir tyrimo įkainius nustato Žemės ūkio ministerija.

Visiems privalomiesiems pieno tyrimams paimtų pieno mėginių paruošimo tyrimams ir jų išsiuntimo (pristatymo) į laboratoriją, mėginių taros (indelių, konteinerių), konservantų išlaidas apmoka supirkėjas. Šios išlaidos ir išlaidos už plombas negali būti išskaičiuojamos iš gamintojo.

II. PIENO SUDĖTIES VERTINIMAS

11. Pieno riebalų ir baltymų kiekis nustatomas ne rečiau kaip tris kartus per mėnesį, ne rečiau kaip po vieną tyrimą laikotarpiais: nuo 1 iki 15 d. ir nuo 16 iki 31 d., ir tyrimo rodikliai taikomi įskaitiniam tiekimo laikotarpiui.

Vidutinis per įskaitinį tiekimo laikotarpį supirkto pieno riebalų ir baltymų kiekis apskaičiuojamas pagal per šį laikotarpį atliktų tyrimų rodiklių aritmetinį vidurkį, išskyrus šių taisyklių 23, 25 ir 26 punktuose numatytus atvejus.

Pieno kiekis pagal bazinius riebalų ir baltymų rodiklius perskaičiuojamas vadovaujantis Žalio pieno kiekio perskaičiavimo pagal bazinius sudėties rodiklius (riebumą ir baltymingumą) į bazinį pieno kiekį metodika, patvirtinta Lietuvos Respublikos žemės ir miškų ministerijos 1998 m. vasario 12 d. įsakymu Nr. 67 (Žin., 1998, Nr. [18-440](#)). Faktinis pieno kiekis perskaičiuojamas į bazinį pagal laboratorijos pateiktą perskaičiavimo (dauginimo) koeficientą.

Perskaičiavimo koeficientas nustatomas vertinant pieno sudėties tyrimo rezultatų šimtąsias procento dalis.

III. PIENO KOKYBĖS VERTINIMAS

12. Supirkimo metu, vadovaujantis Žalio pieno pirminių kokybės rodiklių įvertinimo instrukcija, patvirtinta Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 1999 m. birželio 29 d. įsakymu Nr. 287 (Žin., 1999, Nr. [60-1963](#)), nustatomi pirminiai kokybės rodikliai. Inhibitorines (slopinančiąsias) medžiagas tiria tam nešališkoje akredituotoje pieno ir pieno produktų tyrimams laboratorijoje apmokytas bei turintis jos išduotą pažymėjimą supirkėjo įgaliotas asmuo ir kiekvieną atliktą tyrimą registruoja pieno supirkimo įmonės patvirtintame žurnale, nurodydamas, koku metodu tirta, tyrimo datą, tyrimą atlikusio asmens vardą ir pavardę. Šiame žurnale pasirašo inhibitorines (slopinančiąsias) medžiagas tyręs asmuo ir pieno gamintojas ar jo įgaliotas asmuo.

Pieno supirkimo metu nustačius, kad piene yra inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, pieno siunta neperkama. Tai turi būti įforminama aktu ir iš tos pačios pieno siuntos paimamas tyrimas inhibitorinėms (slopinančiosioms) medžiagoms nustatyti laboratorijoje. Laboratorijoje nustačius inhibitorines (slopinančiąsias) medžiagas, pienas vertinamas, kaip nurodyta šių taisyklių 18 punkte, ir už šį papildomąjį laboratorinį tyrimą, pieno mėginio paruošimo papildomajam tyrimui ir jo išsiuntimo (pristatymo) į laboratoriją, papildomai tiriamo pieno mėginio taros (indelio, konteinerio) išlaidas šiam tyrimui moka gamintojas, o jei inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų nerandama – supirkėjas.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, Žin., 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

13. Pieno kokybės rodikliai bei jų tyrimo periodiškumas turi atitikti lentelėje nurodytus reikalavimus.

Rodiklio pavadinimas	Norma	Tyrimo periodiškumas	Kas nustato
<u>Pirminiai pieno kokybės rodikliai</u>			
Spalva	Balta arba gelsvo atspalvio	Priimant kiekvieną pieno siuntą	Supirkėjas
Kvapas	Be specifinio pašarų ar kitų medžiagų kvapo. Žiemą ir pavasarį galimas silpnas pašarų kvapas	Priimant kiekvieną pieno siuntą	Supirkėjas
Konsistencija	Vienalytė, nesusaldyta, be gleivių, nuosėdų, baltymų dribsnių, sviesto kruopelių ir mechaninių priemaišų	Priimant kiekvieną pieno siuntą	Supirkėjas

Temperatūra	Pieno pardavimo metu – ne aukštesnė kaip 8 °C, išskyrus atvejus, kai pienas pristatomas per 2 val. po melžimo. Į pieno apdorojimo ir perdirbimo įmones atvežto pieno temperatūra neturi viršyti 10 °C	Priimant kiekvieną pieno siuntą, išskyrus atvejus, kai pienas pristatomas per 2 val. po melžimo	Supirkėjas
Skonis	Be specifinio pašarų ar kitų medžiagų skonio. Žiemą ir pavasarį galimas silpnas pašarų prieskonis	Kilus įtarimui	Supirkėjas
Rūgštingumas	Ne didesnis kaip 18 °T	Kilus įtarimui	Supirkėjas
Švarumas	Ne žemesnės kaip I grupės	Kilus įtarimui	Supirkėjas
Tankis	Ne mažesnis kaip 1027 kg/m ³	Kilus įtarimui	Supirkėjas
Neutralizuojančios ir inhibitorinės (slopinančiosios) medžiagos	Turi nebūti	Kilus įtarimui	Supirkėjas
<u>Pieno kokybės rodikliai</u>			
Užterštumas bakterijomis, ne daugiau kaip tūkst./cm ³	100	Ne rečiau kaip du kartus per mėnesį laikotarpiais: nuo 1 iki 15 d. ir nuo 16 iki 31 d.	Laboratorija
Somatinių ląstelių skaičius ne daugiau kaip tūkst./cm ³	400	Ne rečiau kaip tris kartus per mėnesį – ne rečiau kaip po vieną tyrimą laikotarpiais: nuo 1 iki 15 d. ir nuo 16 iki 31 d.	Laboratorija
Inhibitorinės (slopinančiosios) medžiagos	Turi nebūti	Ne rečiau kaip du kartus per mėnesį laikotarpiais: nuo 1 iki 15 d. ir nuo 16 iki 31 d.	Laboratorija
Pieno užšalimo temperatūra ne aukštesnė kaip °C	Minus 0,515	Ne rečiau kaip vieną kartą per-pusmetį	Laboratorija

Pieno kokybės rodiklių vertinimui taikomos šios viršutinės ribos: bendram bakteriniam užterštumui 300 tūkst./cm³, somatinių ląstelių skaičiui – 600 tūkst./cm³.

14. Pieno bakterinis užterštumas įvertinamas pagal per du mėnesius atliktų visų tyrimų geometrinį vidurkį. Somatinių ląstelių skaičius įvertinamas pagal per tris mėnesius atliktų visų tyrimų geometrinį vidurkį. Geometriniam vidurkiui apskaičiuoti naudojami visų per nustatytą laikotarpį atliktų kokybės tyrimų duomenys pagal VMVT gamintojui suteiktą gyvūnų laikymo vietos kodą. Atsiskaitymui už pieną taikomas paskutinis įskaitinį tiekimo laikotarpį apskaičiuotas kokybės tyrimų geometrinis vidurkis.

Jeigu apskaičiuotas pieno bendro bakterinio užterštumo ar somatinių ląstelių geometrinis vidurkis yra didesnis nei nurodytas šių taisyklių 13 punkte ir jeigu per 3 mėnesius po tyrimų ne mažesniu kaip šių taisyklių 13 punkte nurodytu periodiškumu žalias pienas pagal šiuos rodiklius neatitinka 13 punkto reikalavimų, jo priėmimas nutraukiamas, kai supirkėjas pateikia tyrimų protokolus gamintojui, kaip nurodyta šių taisyklių 41 punkte. Dėl leidimo atnaujinti pieno supirkimą gavimo gamintojas kreipiasi į VMVT, kaip nurodyta šių taisyklių 19 punkte.

Už laikotarpį (ne ilgesnį kaip 3 mėnesiai), kai nustatytas pienas, neatitinkantis šių taisyklių 13 punkto reikalavimų dėl bendro bakterinio užterštumo ar somatinių ląstelių geometrinio vidurkio, kol pasiekiami tinkami rodikliai, apmokant už pieną taikoma 15 proc. nuoskaita nuo kainos, kai neatitinka bendro bakterinio užterštumo rodiklis, ir/ar 10 proc. nuoskaita nuo kainos, kai neatitinka somatinių ląstelių rodiklis. Nuoskaitos taikomos už kiekvieną rodiklį atskirai. Abiems rodikliams neatitinkant reikalavimų, nuoskaitos sumuojamos. Nuoskaitos skaičiuojamos nuo kainos, įskaitant mokamus priedus.

15. Atnaujinus pieno pirkimą, geometrinis vidurkis to kokybės rodiklio, dėl kurio buvo nutrauktas pieno supirkimas, pradedamas skaičiuoti iš naujo.

16. Pieno kokybę pagal geometrinį vidurkį vertina laboratorija. Jei geometriniam vidurkiui apskaičiuoti atlikta nepakankamai tyrimų, pieno kokybė įvertinama pagal turimų tyrimų rezultatus.

17. Nustačius, kad pieno užšalimo temperatūra yra aukštesnė negu $-0,515^{\circ}\text{C}$, vienai iš šalių pageidaujant ir per 5 darbo dienas po tyrimų protokolo gavimo raštiškai kreipiantis į VMVT, atliekamas kontrolinis melžimas pieno natūralumo nustatymui, kurio metu imamas kontrolinis mėginys ūkyje:

17.1. kontrolinis mėginys ūkyje turi būti paimtas ne vėliau kaip per 5 dienas po kreipimosi;

17.2. jei tiriant kontrolinį mėginį nustatoma, kad pieno užšalimo temperatūra yra aukštesnė nei minus $0,520^{\circ}\text{C}$, surašomas aktas. Šiuo atveju kainos nuoskaitos netaikomos;

17.3. jei tiriant kontrolinį mėginį nustatoma, kad pieno užšalimo temperatūra yra $-0,520^{\circ}\text{C}$ ar žemesnė, arba į VMVT nesikreipiama, už pieną apmokama taikant 10 proc. nuoskaitą nuo nustatytos pieno kainos, bet ne ilgiau kaip tą įskaitinį tiekimo laikotarpį.

18. Supirkėjas, gavęs informaciją iš laboratorijos, kaip nurodyta šių taisyklių 42 punkte, kad piene yra inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, ne vėliau kaip kitą supirkimo dieną jo supirkimą nutraukia. Iki pieno supirkimo nutraukimo apmokama pagal paskutinius pieno sudėties ir kokybės tyrimo rodiklius. Jeigu inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų rasta pirmoje pristatytoje pieno siuntoje, kaip nurodyta šių taisyklių 6 punkte, iki pieno supirkimo nutraukimo apmokama taikant 20 proc. nuoskaitą nuo kainos.

Inhibitorinės (slopinančiosios) medžiagos piene tiriamos LPT testu. Jeigu supirkėjas pageidauja (kreipiasi raštu į laboratoriją), inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų tyrimas gali būti atliktas papildomai kitais testais.

Dėl leidimo atnaujinti pieno supirkimą gavimo gamintojas kreipiasi į VMVT, kaip nurodyta šių taisyklių 19 punkte.

Jeigu per trijų kalendorinių mėnesių laikotarpį to paties gamintojo parduotame piene antrą kartą randama inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, pieno supirkimas nutraukiamas 15 kalendorinių dienų nuo tyrimo rezultato užfiksavimo laboratorijos duomenų bazėje. Praėjus šiam laikotarpiui, pieno supirkimas gali būti atnaujintas, gamintojui pateikus VMVT leidimą. Apie inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų pakartotinį nustatymą per trijų kalendorinių mėnesių laikotarpį pažymima laboratorijos protokoluose ir duomenų bazėje.

Jeigu gamintojui, kurio ūkis atitinka Reikalavimus higienos sąlygoms pieno gamybos ūkiuose, patvirtintus VMVT direktoriaus 2004 m. gegužės 5 d. įsakymu Nr. B1-429 (Žin., 2004, Nr. [80-2863](#)), nutraukiamas pieno supirkimas 15 dienų, jis turi teisę kreiptis ne vėliau kaip per 2 darbo dienas po pieno supirkimo nutraukimo į teritorinę VMVT, kuri ne vėliau kaip per 2 darbo dienas atlieka patikrinimą, po kurio sprendžia apie pieno supirkimo atnaujinimo galimybę anksčiau nei po 15 dienų ir savo pagrįstą sprendimą pateikia Pieno žaliavos sudėties ir kokybės nagrinėjimo arbitražinei komisijai, patvirtintai VMVT direktoriaus 2003 m. birželio 13 d. įsakymu Nr. B1-535 (toliau – Arbitražinė komisija). Jeigu teritorinė VMVT leidžia pieno supirkimą atnaujinti greičiau, apie tai ji informuoja laboratoriją, kuri tai pažymi duomenų bazėje.

19. Nutraukus pieno pirkimą pagal šių taisyklių 14 ir 18 punktuose nurodytą pagrindą, pieno supirkėjas ar jo įgaliotas asmuo surašo pieno supirkimo nutraukimo aktą, kuriame įrašo pieno supirkimo nutraukimo priežastį ir datą bei nurodo vardą, pavardę, pareigas ir pasirašo. Akte nurodoma pieno gamintojo, kuriam nutraukiamas pieno supirkimas, vardas, pavardė ir gamintojas pasirašo. Pieno pirkimas atnaujinamas, kai gamintojas, atlikęs VMVT Apraše nustatytas procedūras, pateikia VMVT išvadą, leidžiančią toliau parduoti pieną, ir protokolą iš laboratorijos apie tyrimo pieno supirkimo atnaujinimui rezultatus. Šiems tyrimams mėginius paima supirkėjas iš pristatyto į pieno supirkimo punktą pieno arba tiesiogiai iš ūkio. Šiuo atveju išlaidas, nurodytas šių taisyklių 21 punkte, apmoka gamintojas.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

IV. PAPILDOMIEJI TYRIMAI

20. Papildomieji mėginiai (dažnesniu negu numatyta šių taisyklių 11 ir 13 punktuose nurodytu periodiškumu) pieno sudėčiai ir kokybei ištirti imami gamintojo, supirkėjo ar VMVT iniciatyva.

Jeigu VMVT iniciatyva imami papildomieji mėginiai pagal iš pieno gamintojų gautą raštišką registruotą skundą, VMVT atstovai gali mėginius laboratorijos atstovui pristatyti patys. Šiuo atveju išlaidas, nurodytas šių taisyklių 21 punkte, apmoka supirkėjas.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, *Žin.*, 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

21. Už papildomuosius pieno tyrimus, pieno mėginių paruošimo papildomiesiems tyrimams ir jų išsiuntimo (pristatymo) į laboratoriją, papildomai tiriamų pieno mėginių taros (indelių, konteinerių), konservantų išlaidas apmoka juos inicijavusi pusė, išskyrus šių taisyklių 12 ir 20 punktuose numatytus atvejus.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, *Žin.*, 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

22. Gamintojui raštu kreipiantis į supirkėją dėl papildomųjų pieno sudėties ar kokybės tyrimų atlikimo, supirkėjas privalo per tą įskaitinį laikotarpį, kai kreipiasi gamintojas, paimti, paruošti ir perduoti mėginius laboratorijos atstovui arba, pageidaujant gamintojui, perduoti mėginius jam pačiam pristatyti į laboratoriją.

23. Supirkėjas pagal supirkėjo įgalioto asmens raštišką pranešimą gali arba gamintojo raštišku prašymu privalo paimti papildomuosius mėginius pieno sudėčiai ištirti, jeigu to paties gamintojo pieno sudėties rodikliai skiriasi nuo prieš tai tirta mėginio nustatytųjų daugiau kaip 0,8 proc. riebalų ar 0,4 proc. baltymų. Šiuo atveju vietoj tos dienos rezultato, kai buvo nustatytas nurodytas rodiklių skirtumas, įskaitomas papildomojo tyrimo rezultatas. Jeigu yra gamintojo raštiškas prašymas arba supirkėjo įgalioto asmens raštiškas pranešimas dėl papildomojo mėginio paėmimo, o įskaitinis laikotarpis baigėsi ir galimybės tą įskaitinį laikotarpį paimti papildomąjį mėginį nebėra, tos dienos, kai pieno sudėties rodiklis skyrėsi nuo ankstesniojo nurodytojo dydžiu, rodiklis apskaičiuojamas pagal paskutinio ir priešpaskutinio tyrimo rezultatų aritmetinį vidurkį, kuris laikomas galutiniu paskutinio tyrimo rezultatu.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, *Žin.*, 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

24. Pieno sudėties papildomųjų tyrimų rezultatai (išskyrus šių taisyklių 25 ir 26 punktuose numatytus atvejus) taikomi įskaitiniam laikotarpiui, kaip nurodyta 11 punkte.

Bakterinio užterštumo ir somatinių ląstelių skaičiaus papildomųjų tyrimų duomenys įtraukiami į geometrinio vidurkio apskaičiavimą bendra tvarka (išskyrus šių taisyklių 25 ir 26 punktuose numatytus atvejus). Atliekant užšalimo temperatūros papildomąjį tyrimą, už pieną atsiskaitoma pagal šio tyrimo rezultatą nuo mėginio paėmimo tyrimui datos iki įskaitinio tiekimo laikotarpio pabaigos.

25. Kai abejojama dėl pieno kokybės ar sudėties rodiklių, gamintojas ar supirkėjas po tyrimo protokolų gavimo gali raštu kreiptis į VMVT dėl tyrimo rezultato anuliavimo. VMVT ne vėliau kaip per 15 darbo dienų raštu informuoja laboratoriją ir supirkėją apie priimtą sprendimą. Jei tyrimų duomenys anuliuojami, už pieną turi būti atsiskaityta pagal perskaičiuotus rezultatus.

26. Pagal raštišką VMVT pranešimą laboratorijai ir supirkėjui, nurodžius pagrįstą tyrimų anuliavimo priežastį, prieš tai buvę pieno sudėties ir kokybės tyrimų duomenys anuliuojami ir bendro bakterijų bei somatinių ląstelių skaičiaus rodikliai neįtraukiami į geometrinio vidurkio apskaičiavimą.

27. Jeigu į laboratoriją atsiunčiamas netinkamas tyrimui mėginys arba dėl kurių nors pateisinamų priežasčių (nenugalimos jėgos aplinkybių ar kt.) laboratorijoje negalėjo būti atliktas pieno sudėties ir kokybės tyrimas, supirkėjas tą įskaitinį laikotarpį privalo paimti mėginius tyrimams. Jeigu įskaitinis laikotarpis baigėsi ir galimybės tą įskaitinį laikotarpį paimti mėginį nebėra, pieno sudėtis vertinama pagal paskutinio ir prieš jį nustatyto (priešpaskutinio) tyrimo

rezultatų aritmetinį vidurkį, o bendro bakterinio užterštumo ir somatinių ląstelių rodikliams taikomas paskutinis apskaičiuoto atitinkamo rodiklio geometrinis vidurkis.

V. SUPERKAMO PIENO APSKAITA

28. Superkamo pieno apskaita tvarkoma pagal nustatytos formos pirkimo–pardavimo dokumentus.

29. Iš fizinių asmenų, išskyrus tuos, iš kurių pienas superkamas tiesiogiai iš ūkio, superkamo pieno apskaitos dokumentai yra: pieno supirkimo ir priskaitymo knygelė bei pieno pirkimo apskaitos žurnalas (žiniaraštis).

30. Pieno supirkimo ir priskaitymo knygelę gamintojui išduoda supirkėjas. Jos registruojamos įrištame, numeruotais lapais, vyr. finansininko (arba vadovo) pasirašytame, antspauduotame pieno supirkimo ir priskaitymo knygelės išdavimo registracijos žurnale.

31. Pieno supirkimo ir priskaitymo knygelėse supirkimo dienomis žymimas faktinis nupirkto pieno kiekis litrais (jei pienas perkamas matuojant tūrį) ir kilogramais (pieno kiekis, perskaičiuotas iš tūrio į masę arba pasvertas). Jei iš gamintojo pienas nebuvo nupirkamas dėl pirminių kokybės rodiklių neatitikimo, pieno supirkimo ir priskaitymo knygelėje tą dieną rašoma „Grąžinta“, nurodant grąžinimo priežastį (rūgštingumas, švarumas, skonis ar kitos).

32. Pieno supirkimo ir priskaitymo knygelėse supirkėjas pažymi per įskaitinį tiekimo laikotarpį iš gamintojo supirkto pieno riebumą, baltymingumą, faktinį pieno kiekį, kokybės rodiklius pagal laboratorijos duomenis. Įrašai atliekami ne vėliau kaip per 7 dienas po įskaitinio tiekimo laikotarpio pabaigos.

33. Pieno pirkimo apskaitos žurnalą (žiniaraštį) pildo supirkėjas. Apskaitos žurnalas turi būti įrištas arba susegtas metalinėmis sankabėlėmis, numeruotais lapais, vyr. finansininko (arba vadovo) pasirašytas ir antspauduotas. Žurnale turi būti surašytos gamintojų pavardės ir kodai, atitinkantys klįjuojamus ant pieno mėginių indelių.

34. Pieno pirkimo apskaitos žurnale (žiniaraštyje) įrašomas tik faktinis supirkto pieno kiekis (kilogramais). Iš laboratorijos gauti tyrimų protokolai yra privalomi apskaitos žurnalo (žiniaraščio) priedai.

35. Pieno pirkimas iš gamintojų – juridinių asmenų ir fizinių asmenų, iš kurių pienas superkamas tiesiogiai iš ūkio, įforminamas išrašant važtaraštį.

36. Gamintojo išrašytame pieno važtaraštyje turi būti nurodytas faktinis pieno kiekis ir, jei yra nustatyta, sudėties ir/arba kokybės rodikliai. Priimdamas pieną, supirkėjas šiame važtaraštyje turi įrašyti tuos duomenis, kuriuos tikrina priėmimo metu: faktinį pieno kiekį, pirminius kokybės ir/arba kitus, įmonėje nustatomus, rodiklius.

37. Atsiskaitymui už kiekvieną mėnesį patiektą pieną įforminti fiziniams ir juridiniams asmenims išrašomos PVM sąskaitos faktūros ar sąskaitos faktūros, nurodant visų to mėnesio įskaitinių laikotarpių duomenis, vadovaujantis Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 2004 m. vasario 27 d. įsakymu Nr. 3D-80 „Dėl papildomų privalomųjų rekvizitų pridėtinės vertės mokesčio sąskaitose faktūrose, sąskaitose-faktūrose ir kituose žemės ūkio produkcijos pirkimo dokumentuose nustatymo“ (Žin., 2004, Nr. [33-1077](#), Nr. 126-4543). Šiuos dokumentus supirkėjas juridiniams asmenims ir fiziniams asmenims, iš kurių pienas superkamas tiesiogiai iš ūkio, išrašo pagal pieno važtaraščių, o fiziniams asmenims, iš kurių pieną stacionariuose punktuose priima supirkėjas, – pagal pieno pirkimo apskaitos žurnalo (žiniaraščio) duomenis.

38. Pieno apskaitos dokumentai saugomi buhalterinės apskaitos dokumentams teisės aktais nustatytais terminais.

Gamintojas pieno apskaitos dokumentus (pieno supirkimo ir priskaitymo knygeles ar važtaraščius, PVM sąskaitas faktūras ar sąskaitas faktūras) turi saugoti ne trumpiau kaip trejus metus nuo tų metų, kuriais jie buvo sudaryti, pabaigos.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

VI. PIENO KAINOS APSKAIČIAVIMAS IR ATSISKAITYMAS UŽ PIENĄ

39. Už gamintojo parduotą pieną apmokama pieno pirkimo-pardavimo sutartyje, atitinkančioje Tipinės pieno pirkimo-pardavimo sutarties sąlygų reikalavimus, nustatyta tvarka. Už supirktą pieną atsiskaitoma pagal laboratorijos tyrimų duomenis.

VII. INFORMAVIMAS APIE TYRIMO REZULTATUS

40. Laboratorija ne vėliau kaip po 3 darbo dienų nuo mėginių atvežimo pateikia supirkėjui tyrimo protokolus 2 egzemplioriais, elektroniniu paštu – ne vėliau kaip po 2 parų, kai mėginiai atvežti pagal suderintą grafiką. Protokoluose pateikiama aktuali informacija pieno supirkimo klausimais ir ankstesnio pieno sudėties tyrimo duomenys. Tyrimo protokolai negali būti taisomi, tikslinami ir kitaip keičiami. Laboratorijoje atliktų tyrimų duomenys pagal gamintojų kodus pateikiami laboratorijos interneto svetainėje. Laboratorijos protokolai saugomi pieno supirkimo punkte ne mažiau kaip tris mėnesius.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, *Žin.*, 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

41. Supirkėjas pateikia gamintojui susipažinti pasirašytinai vieną tyrimo protokolo egzempliorių ne vėliau kaip per 2 darbo dienas po jų gavimo iš laboratorijos.

Laboratorija ne vėliau kaip per 2 paras nuo mėginių atvežimo į laboratoriją pateikia tyrimų duomenis elektroniniu paštu arba SMS žinute tiesiogiai pageidaujantiems gamintojams ar jų atstovams, pateikusiems elektroninio pašto adresus ar mobilaus telefono numerius.

42. Laboratorija, nustačiusi, kad piene yra inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, po mėginio tyrimo rezultato užfiksavimo duomenų bazėje el. paštu arba, supirkėjui pateikus reikiamus duomenis, SMS žinutėmis informuoja supirkėją, kuris gautą informaciją registruoja ir praneša gamintojui.

VIII. REIKALAVIMAI GAMINTOJAMS

43. Gamintojas privalo parduodamą pieną paruošti pagal 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos Reglamente (EB) Nr. 853/2004 ir šiose taisyklėse nustatytus reikalavimus ir sutartą pieno kiekį pristatyti laiku į pieno supirkimo vietą, vykdyti kitus sutarties su supirkėju bei teisės aktais nustatytus reikalavimus.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, *Žin.*, 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

IX. REIKALAVIMAI SUPIRKĖJAMS

44. Supirkėjas privalo užtikrinti: pieno pirminių kokybės rodiklių ištyrimą tinkamais metodais, pieno kiekio teisingą įvertinimą, pieno priėmimą laiku pagal grafiką, tinkamą pieno mėginių paėmimą šiose taisyklėse nurodytu periodiškumu, paruošimą, laikymą, gabenimą ir išsaugojimą iki išsiuntimo į laboratoriją, lydimųjų dokumentų teisingą pildymą, kontenerių plombavimą, pieno apskaitos dokumentų teisingą išdavimą ir pildymą, mėginių identifikavimo etikečių panaudojimo kontrolę, atsiskaitymą už supirktą pieną pagal sutartyje nustatytą kainą ir numatytu laiku, kitų sutarties su gamintoju reikalavimų vykdymą, operatyvų gamintojo informavimą apie laboratorijos tyrimo rezultatus, gamintojų supažindinimą su aktualia informacija, pateikiama tyrimo protokoluose (ši informacija turi būti pieno supirkimo vietose), sutarties su laboratorija ir Nacionaline mokėjimo agentūra prie Žemės ūkio ministerijos reikalavimų bei kitų teisės aktais nustatytų reikalavimų vykdymą.

X. REIKALAVIMAI ĮGALIOTAI LABORATORIJAI

45. Laboratorija privalo:

45.1. būti nešališka ir akredituota pagal standarto LST EN ISO/IEC 17025 reikalavimus tyrimų įstaiga, turinti juridinio asmens statusą. Ji privalo būti akredituota visiems 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos Reglamente (EB) Nr. 853/2004 ir šiose taisyklėse nurodytiems pieno sudėties ir kokybės tyrimams;

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, *Žin.*, 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

45.2. laiku teikti supirkėjui ir gamintojui informaciją apie tyrimo rezultatus, užtikrinti sutarties su supirkėju reikalavimų vykdymą;

45.3. nuolat informuoti VMVT apie netipinių pieno mėginių iš supirkėjo pateikimą (informuojamas ir supirkėjas), tyrimų atlikimo periodiškumo nesilaikymą, identifikavimo kodų nepateikimą, tyrimų atlikimo nutraukimą supirkėjams bei priežastis, pieno mėginių pateikimo grafiko nesilaikymą.

46. Laboratorija turi turėti:

46.1. transportą su šaldymo įranga pieno mėginiams gabenti, ir tinkamas patalpas mėginiams laikyti iki tyrimo (4 ± 2 °C);

46.2. šiuolaikišką rutininę įrangą, įteisintą nustatyta tvarka tirti superkamo pieno sudėties ir kokybės rodiklius (riebalų ir baltymų kiekį, somatinių ląstelių skaičių, bendrą bakterinį užterštumą, pieno užšalimo temperatūrą ir inhibitorines (slopinančiąsias) medžiagas). Rutininių sudėties nustatymo metodų tikslumas laboratorijoje turi būti užtikrintas pamatiniais fizikiniais ir cheminiais metodais. Rutininių kokybės nustatymo metodų tikslumas laboratorijoje turi būti užtikrintas pamatiniais metodais, atliekamais pagal 1991 m. vasario 14 d. Komisijos sprendimą 91/180/EEB, nustatantį tam tikrus žalio ir termiškai apdoroto pieno tyrimų ir analizės metodus. Laboratorija ne rečiau kaip 1 kartą per 3 mėnesius turi dalyvauti tarptautiniuose tarplaboratoriniuose palyginamuosiuose bandymuose.

47. Laboratorijoje privalo veikti kokybės vadybos sistema, atitinkanti LST EN ISO/IEC 17025 reikalavimus ir užtikrinanti tikslų visų tyrimų atlikimą, kompiuterinę laboratorijos darbo ir informacijos valdymo sistemą, apimanti mėginių registravimą, tyrimų eigos tikrinimą, duomenų apdorojimą, vidinę laboratorijos kokybės kontrolę, tyrimo protokolų paruošimą, tyrimų duomenų analizę.

48. Laboratorija turi vykdyti kitus teisės aktais nustatytus reikalavimus.

XI. PIENO SUPIRKIMO TVARKOS KONTROLĖ

49. Supirkimą reglamentuojančių dokumentų vykdymo kontrolę atlieka įgaliotos institucijos pagal savo kompetenciją.

50. Pieno tyrimo sistemos priežiūrą pagal nustatytą tvarką vykdo VMVT.

51. Ginčai sprendžiami derybų būdu, o ginčus, susijusius su perkamo ir parduodamo pieno sudėties ir kokybės vertinimu, taip pat sprendžia ir VMVT. Nepavykus susitarti – ginčai sprendžiami teismine tvarka.

Priedo pakeitimai:

Nr. [185](#), 2002-05-15, *Žin.*, 2002, Nr. 49-1920 (2002-05-17), i. k. 1022330ISAK00000185

Nr. [3D-245](#), 2003-06-20, *Žin.*, 2003, Nr. 60-2739 (2003-06-25), i. k. 1032330ISAK003D-245

Nr. [3D-527](#), 2005-11-11, *Žin.*, 2005, Nr. 135-4868 (2005-11-15), i. k. 1052330ISAK003D-527

PIENO MĖGINIŲ ĖMIMO IR RUOŠIMO IŠSIŪSTI Į LABORATORIJĄ TVARKA

I. BENDROSIOS NUOSTATOS

1. Mėginiai tyrimui imami supirkimo vietose pagal šių taisyklių ir laboratorijos nustatytą tvarką. Mėginio tara, laboratorijos suteiktas identifikavimo kodas, konteinerio plomba, mėginio tūris ir naudojami konservantai turi atitikti šios tvarkos ir laboratorijos techninius reikalavimus.

Mėginiai paruošiami ir pristatomi į laboratoriją ne ilgiau kaip per 24 valandas po mėginio paėmimo laikantis suderinto mėginių pateikimo grafiko.

II. MĖGINIUS IMANTIS PERSONALAS

2. Mėginius ima asmenys, turintys terminuotą VMVT išduotą kvalifikacinį pažymėjimą ir supirkėjo įgaliojimą šiam darbui atlikti. Šių asmenų darbą kontroliuoja VMVT. Pieno priėmimo ir mėginių paėmimo metu privalo dalyvauti gamintojai ar jų įgalioti atstovai (komisijos). Mėginių perdavimo įgaliotam laboratorijos atstovui metu gali dalyvauti gamintojai ar jų įgalioti atstovai (komisijos).

III. MĖGINIŲ ĖMIMO PRIEMONĖS

3. Mėginių ėmimo priemonės turi būti pagamintos iš nerūdijančio plieno arba kitos tinkamos tokio pat stiprumo medžiagos, kuri nesukelia mėginio pokyčių, galinčių turėti įtakos tyrimo rezultatams. Jos turi būti tvirtos, kad nesideformuotų, ir pakankamai lengvos, kad mėginį imantis asmuo galėtų lengvai sukioti. Mėginių ėmimo priemonės turi būti švarios ir sausos. Visi paviršiai turi būti lygūs ir be įtrūkių. Mėginių ėmimo mikrobiologiniams tyrimams priemonės turi būti sterilios, išskyrus atvejus, kai rutininiu būdu naudojant tam tikrą tyrimo įrangą tiriamas konservuotas mėginys. Tais atvejais, kai naudojamos automatinės ar pusiau automatinės mėginių ėmimo priemonės (prietaisai, įtaisai ar pan.), jos turi būti išbandytos praktiškai ir reguliariai tikrinamos.

3.1. Mėginių ėmimo mikrobiologiniams tyrimams priemonės, kai rutininiu būdu tiriamas konservuotas mėginys, paruošiamos pagal LST EN ISO 707 standarto 5.1.2 punkte nurodytus reikalavimus arba šiais būdais:

3.1.1. dezinfekuojant natrio hipochlorito tirpalu (200 mg/l aktyvaus chloro) arba jodoformo tirpalu (nuo 40 mg/l iki 50 mg/l aktyvaus jodo), arba kita dezinfekcijos priemone, arba įmerkiant ne trumpiau kaip 30 s į ne žemesnės kaip 85 °C temperatūros vandenį, kuris nuo paviršiaus pašalinamas, pavyzdžiui, nukratant;

3.1.2. prieš imant mėginį, mėginių ėmimo priemonės perskalaujamos tiriamuoju pienu.

3.2. Mėginių ėmimo priemonės yra šios:

3.2.1. nardinamosios maišyklės ir maišytuvai.

Nardinamųjų maišyklių ir maišytuvų maišymo plotas didelėse talpyklose turėtų būti toks, kad sujudintų visą pieną, bet nesukeltų daug putų. Šios priemonės turi būti tokios formos, kad nebrauktų vidinio taros paviršiaus.

Pieniui maišyti kibiruose ar bidonuose naudojamą nardinamąją maišyklę sudaro 150 mm skersmens diskas, perforuotas šešiomis 12,5 mm skersmens skylėmis. Disko centras pritvirtintas prie metalinio strypo, kurio kitame gale yra kilpos pavidalo rankena. Strypas kartu su rankena turi būti ne trumpesnis kaip vieno metro.

Didesnių talpyklų nardinamoji maišyklė susideda iš ne trumpesnio kaip 2 m strypo ir prie jo pritvirtinto 300 mm skersmens disko, perforuoto 12 skylių, kurių kiekvienos skersmuo 30 mm.

Didelių indų arba talpyklų, automobilių ir geležinkelio cisternų turiniui sumaišyti patartina naudoti mechaninius maišytuvus;

3.2.2. samčiai.

Mėginiai gali būti imami samčiais, pritvirtintais prie nelanksčios, ne trumpesnės kaip 150 mm rankenos. Samčio talpa – ne mažesnė kaip 250 ml;

3.2.3. vamzdeliai.

Mėginiai gali būti imami ir metaliniu 7–9 mm vidinio skersmens cilindro formos vamzdeliu. Jis lėtai nuleidžiamas į indo dugną taip, kad vamzdelis prisipildytų pieno iki inde esančio lygio. Viename supirkimo punkte turi būti naudojami tik to paties skersmens vamzdeliai.

IV. MĖGINIŲ TARA

4. Mėginių tara turi atitikti laboratorijos techninius reikalavimus. Vienkartinio naudojimo mėginių indeliai turi būti tinkami mikrobiologinių tyrimų mėginiams paimti ir turi būti pagaminti iš sertifikuotos pirminės žaliavos.

Pieno mėginiai imami į laboratorijos vienkartinius pieno mėginių indelius. Už visus indelius laboratorijai apmoka supirkėjai. Tais atvejais, kai už indelius pagal šių taisyklių 12 ir 21 punktus moka gamintojai, supirkėjai šias lėšas išskaičiuoja iš gamintojų.

5. Ištyrus pieno mėginius, vienkartiniai mėginių indeliai VI „Pieno tyrimai“ laboratorijoje susmulkinami (supresuojami), siekiant išvengti pakartotinio jų panaudojimo galimybės. Susmulkintų (supresuotų) vienkartinių pieno mėginių indelių laužas grąžinamas pieno supirkimo įmonei arba perduodamas kitur, kaip tai numatyta su pieno supirkimo įmonėmis sudarytose sutartyse.

V. MĖGINIŲ ATRINKIMO TVARKA

6. Prieš imant mėginius pienas turi būti gerai išmaišytas rankiniu ar mechaniniu būdu, siekiant gauti reprezentatyvų visos siuntos mėginį. Maišymas priklauso nuo:

6.1. pieno tūrio talpykloje;

6.2. talpyklos formos ir talpos;

6.3. pieno temperatūros;

6.4. laiko, kurį pienas buvo nejudinamas.

Mėginys turi būti paimtas tik išmaišius, kol pienas dar juda. Mėginio imama ne mažiau kaip 2/3 indelio talpos, kad jo užtektų tyrimui ir kad mėginį prieš tyrimą būtų galima gerai išmaišyti. Indelis neturi būti labai pilnas, nes gali nusilaistyti nusistoję riebalai.

7. Pieno sudėties ir kokybės tyrimui imamas vienkartinis pieno mėginys pagal laboratorijos techninius reikalavimus.

8. Jei pieno siunta pristatoma keliuose induose, sudaromas jungtinis mėginys proporcingai pieno tūriui.

9. Kai tuo pačiu metu skirtingiems tyrimams imama keletas mėginių, tai mėginys mikrobiologiniams tyrimams turi būti imamas pirmas.

10. Mėginiai pieno riebalų, baltymų, somatinių ląstelių kiekiui, bakteriniam užterštumui ir pieno užšalimo temperatūrai nustatyti konservuojami pieno supirkimo vietose iš karto po paėmimo konservantais, nurodytais laboratorijos techniniuose reikalavimuose.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

VI. MĖGINIŲ ĖMIMAS

11. Mėginių ėmimas iš bidono ir kibiro

Atsargiai panerti nardinamąją maišyklę į pieno bidoną, saugant, kad pienas nenusilaistytų, leisti ją iki dugno ir greitai traukti į viršų, sukeliant skysčio maišymą iš apačios į viršų. Šiais

aukštn žemyn judesiais pienas gerai išmaišomas, prie bidono kaklelio nepaliekant prilipusių pieno riebalų. Imant mėginį iš kibiuro, pienas rūpestingai išmaišomas mentele arba nardinamąja maišykle.

12. Mėginių ėmimas iš svėrimo vonios

Tinkamas mėginys paimamas tuomet, kai pienas gerai išmaišomas svėrimo vonioje. Iš dalies tai atliekama pilant pieną į svėrimo indą. Išmaišymo lygis priklauso nuo indo formos ir pylimo būdo. Svarbu dar pamaišyti rankiniu ar mechaniniu būdu, kad vienodai pasiskirstytų riebalai.

13. Mėginių ėmimas iš pieno atšaldymo vonių ar talpyklų ūkyje

Pienas maišomas mechaniškai, kol pasiekiamas homogeniškumas (mažiausiai 5 min.). Jeigu talpykloje įrengta periodinė, programuota pagal laiką maišymo sistema, mėginiai gali būti imami pamaišius 1–2 min. Jeigu talpykloje pieno yra mažiau nei 15% jos talpos, maišoma rankiniu būdu.

14. Mėginių ėmimas iš sekcijinių talpyklų

Jeigu pienas yra keliuose talpyklose (ar jos sekcijose), mėginys pirminiams kokybės rodikliams nustatyti (kilus įtarimui) imamas iš kiekvienos talpyklos, prieš tai išmaišius. Jeigu iš kiekvienos talpyklos (sekcijos) paimti mėginiai atskirai netikrinami, tai jie sumaišomi tokiu santykiu, kuris atitinka pieno kiekį atskirose talpyklose ar sekcijose. Mėginys imamas iš šio proporcingai sumaišyto ir kruopščiai išmaišyto pieno.

15. Automatinis ar pusiau automatinis mėginių ėmimas

Kai pienas surenkamas didelėmis pieno cisternomis, gali būti naudojami automatiniai arba pusiau automatiniai mėginių atrinktuvai. Šių atrinktuvų tinkamumą turi patikrinti tam įgaliota institucija.

VII. MĖGINIŲ IDENTIFIKAVIMAS IR LYDIMŲJŲ DOKUMENTŲ PARENGIMAS

16. Siunčiamiems tirti į laboratoriją mėginiams identifikuoti ant kiekvieno indelio mėginį imantis asmuo arba gamintojas užklijuoja gamintojo identifikavimo numerį (brūkšninį kodą).

17. Etiketę su gamintojo identifikavimo numeriu parengia laboratorija. Etikečių naudojimą kontroliuoja supirkėjas. Išduotų ir panaudotų etikečių apskaitą vykdo laboratorija. Supirkėjas privalo išduoti laboratorijos parengtas etiketes gamintojams, turintiems melžimo ir šaldymo įrangą, arba gamintojai gali etiketes įsigyti laboratorijoje, apie tai informavę supirkėją ir gavę jo įgaliojimą.

18. Mėginiai su užklijuotu gamintojo brūkšniniu kodu sudedami į konteinerius. Mėginį paėmęs asmuo užpildo nustatytos formos lydraštį, kuris įdedamas į konteinerį. Mėginių gabenimui gali būti naudojama kita laboratorijos techniniuose reikalavimuose nurodyta tara.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

VIII. PLOMBAVIMAS

19. Konteineriai turi būti plombuojami pieno supirkimo vietose mechaniniam poveikiui atspariomis plombomis su skeneriu nuskaitomu brūkšniniu kodu.

Konteinerių plombas perka ir jų apskaitą tvarko VĮ „Pieno tyrimai“. Kiekvienam konteineriui priskiriama individuali plomba.

20. Konteinerio plombos numeris turi būti įrašytas lydraštyje. Tuo atveju, kai atvežto į laboratoriją konteinerio su pieno mėginiais plombos brūkšninis kodas nenuskaitomas skeneriu, laboratorija sutikrina, ar plombos numeris sutampa su įrašytuoju lydraštyje.

21. Plombos numeris spausdinamas tyrimų protokoluose.

IX. MĖGINIŲ LAIKYMAS

22. Paruošti mėginiai jų paėmimo, saugojimo vietoje turi būti laikomi žemos teigiamos temperatūros, ne aukštesnės kaip 8 °C, aplinkoje, transportavimo metu – ne aukštesnės kaip 10° C aplinkoje.

X. MĖGINIŲ IŠSIUNTIMAS

23. Išsiunčiamų į laboratoriją mėginių temperatūra turi būti žema teigiama ir neviršyti 8° C. Laboratorijos įgaliotam asmeniui ar kontroliuojančiai institucijai privalo būti sudaryta galimybė, kilus įtarimui, patikrinti mėginių ar aplinkos, kurioje jie laikomi, temperatūrą.

24. Jeigu gamintojas raštu kreipiasi į supirkėją dėl papildomųjų tyrimų ir leidimo pačiam pristatyti mėginius į laboratoriją, laikantis privalomų mėginio laikymo ir gabenimo reikalavimų, supirkėjas privalo paimti, paruošti mėginius šiems tyrimams ir perduoti juos gamintojui.

25. Supirkimo vietose surinkti pieno mėginiai supirkėjo transportu atvežami į vietą, sutartą su laboratorija. Plombuotus konteinerius supirkėjo įgaliotas asmuo perduoda laboratorijos įgaliotam asmeniui. Surašomas konteinerių perdavimo–priėmimo aktas, kuriame nurodomas mėginių perdavimo laikas, perduodamų konteinerių numeriai, tyrimo kodai, mėginių skaičius, temperatūra (jei ji buvo patikrinta) ir kurį pasirašo supirkėjo ir laboratorijos įgalioti asmenys ir dalyvaujantys gamintojai.

26. Įgaliotas laboratorijos asmuo nustatęs, kad konteineriai neplombuoti ar pažeisti, jų nepriima ir apie tai pažymi mėginių perdavimo–priėmimo akte.

27. Mėginiai iš sutartų vietų gabenami į laboratoriją pagal iš anksto suderintą grafiką šios laboratorijos transportu.

28. Pervežant konteinerius iš supirkimo vietų į pieno perdirbimo (supirkimo) įmones arba sutartas su laboratorija vietas, konteineriai turi būti registruojami apskaitos žurnaluose arba konteinerių priėmimo–perdavimo aktuose. Juose turi būti nurodytas supirkimo punkto pavadinimas, konteinerių numeriai, data, laikas, atsakingų asmenų pareigos, vardai, pavardės, parašai.

2 priedas. *Neteko galios nuo 2006-08-04*

Priedo naikinimas:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin. 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

PIENO SUPIRKIMAS IMANT MĖGINIUS IŠ KIEKVIENOS PIENO SIUNTOS

Pienas superkamas pagal šią tvarką, kai to pageidauja pieno gamintojas ar supirkėjas. Superkant pieną, kai pieno mėginiai imami iš kiekvienos siuntos, taikomos šios papildomos nuostatos:

1. Gamintojai:

- 1.1. turi turėti melžimo ir šaldymo įrangą;
- 1.2. savo brūkšniniu kodu užklįjuoja mėginių tarą (indelius);
- 1.3. paruoštus išsiųsti konteinerius su pieno mėginiais registruoja apskaitos žurnaluose ir iki perdavimo į laboratorijos transportą laiko teigiamoje, bet ne aukštesnėje kaip +8°C, temperatūroje;

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, Žin., 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

1.4. pieno mėginius ne rečiau kaip 8 kartus per mėnesį į sutartas su VĮ „Pieno tyrimai“ vietas pristato savo transportu, nepažeisdami 1.3 punkte nurodyto mėginių laikymo temperatūrinio režimo, jeigu nėra sutarę su laboratorija dėl pieno mėginių surinkimo tuo pačiu periodiškumu tiesiogiai iš ūkio.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, Žin., 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

2. Supirkėjas paima vienkartinius pieno mėginius (vieną konservuotą ir vieną nekonservuotą) iš kiekvienos superkamo pieno siuntos ir, dalyvaujant gamintojui ar jo įgaliotam atstovui, paruošia išsiųsti konteinerius su pieno mėginiais, kurie tiriami ne rečiau kaip:

- 2.1. iš kiekvienos pieno siuntos – pieno sudėčiai ir somatinių ląstelių skaičiui nustatyti;
- 2.2. keturis kartus per mėnesį – bendram bakteriniam užterštumui nustatyti;
- 2.3. keturis kartus per mėnesį – inhibitorinėms (slopinančiosioms) medžiagoms nustatyti;
- 2.4. vieną kartą per 6 mėnesius – pieno užšalimo temperatūrai nustatyti.

3. Už pieną atsiskaitoma pagal faktinę kiekvienos siuntos pieno sudėtį.

Siuntai taikomas tą įskaitinį laikotarpį atliktų pieno sudėties tyrimų aritmetinis vidurkis, jeigu:

3.1. į laboratoriją atsiunčiamas netinkamas tyrimui mėginys arba dėl kurių nors pateisinamų priežasčių (nenugalimos jėgos aplinkybių ar kt.) laboratorijoje negalėjo būti atliktas kurios nors siuntos pieno sudėties tyrimas;

3.2. to paties gamintojo pieno sudėties rodikliai skiriasi nuo prieš tai tirtų mėginių nustatytųjų daugiau kaip 0,8 proc. riebalų ar 0,4 proc. baltymų. Šio tyrimo rezultatas neįskaitomas.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

4. Nutraukus pieno supirkimą dėl inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, tiriamas kitos dienos pieno mėginys. Pastarąjį mėginį į laboratoriją, nepažeisdamas mėginių laikymo temperatūrinio režimo, gali pristatyti gamintojas arba atsiųsti per pieno supirkėją. Jeigu iš šio tyrimo paaiškėja, kad piene nėra inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, pieno supirkimas, gavus informaciją iš laboratorijos ir VMVT išvadas, atnaujinamas.

Nutraukus pieno supirkimą visais kitais Pieno supirkimo taisyklėse numatytais atvejais, dėl pieno supirkimo atnaujinimo gamintojas kreipiasi į VMVT.

5. Už pieno tyrimus po pieno supirkimo nutraukimo, pieno mėginių paruošimo šiems tyrimams ir jų pristatymo į laboratoriją, tiriamų pieno mėginių taros, konservantų išlaidas apmoka gamintojai.

6. Mėginį paėmęs supirkėjas užpildo nustatytos formos lydraštį 3 egzemplioriais (po vieną supirkėjui, gamintojui ir laboratorijai) ir pasirašo. Lydraštyje, jeigu pageidauja gamintojas, įrašomas

parduoto pieno, iš kurio paimtas mėginys, kiekis. Pieno mėginių paėmimo metu dalyvaujantis gamintojas ar jo įgaliotas atstovas privalo pasirašyti lydraštyje, nurodymas pareigas, vardą, pavardę ir datą. Jei nėra parašų ar neįrašyta pieno mėginio paėmimo data, pieno mėginiai laboratorijoje netiriami, o mėginį paėmęs supirkėjas kompensuoja laboratorijai išlaidas, lygias pieno mėginio tyrimo įkainiui.

Mėginiai su užklijuotais gamintojo brūkšniniais kodais ir lydraštis dedami į konteinerį, kuris, dalyvaujant gamintojui, užplombuojamas mechaniniam poveikiui atspariomis plombomis su aiškiai skeneriu nuskaitymais brūkšniniais kodais.

7. Laboratorija:

7.1. aprūpina gamintojus brūkšniniais kodais;

7.2. surenka pieno mėginius ne rečiau kaip 8 kartus per mėnesį pagal laboratorijai žinomą grafiką tiesiogiai iš ūkių arba su gamintojais ar supirkėjais sutartų vietų ir gabena savo transportu su šaldymo įranga teigiamoje, bet ne aukštesnėje kaip +8°C, temperatūroje;

7.3. perduoda tyrimo duomenis atsiskaitymui už pieną supirkėjams ir tiesiogiai – elektroniniu paštu arba SMS žinutėmis, arba faksu – gamintojams arba jų įgaliotiesiems atstovams ne vėliau kaip per vieną parą nuo darbo dienomis paimtų mėginių atvežimo į laboratoriją. Radus piene inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų arba nustačius, kad pienas neatitinka Pieno supirkimo taisyklių 13 punkto reikalavimų, supirkėjai ir gamintojai informuojami nedelsiant (elektroniniu paštu ar SMS žinutėmis, arba faksu);

7.4. pateikia gamintojams įgaliotos laboratorijos techninius reikalavimus atitinkančius mažus konteinerius pieno mėginiams pervežti bei vienkartinius pieno mėginių indelius.

Punkto pakeitimai:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, Žin., 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

8. Pieno supirkėjui kilus įtarimui dėl pieno kokybės, iš pieno siuntos paimami mėginiai papildomajam inhibitorinių (slopinančiųjų) medžiagų, užšalimo temperatūros ar bakterinio užterštumo tyrimui atlikti. Apie tai raštu informuojama VMVT. Konteinerį su mėginiais pristato supirkėjas arba gamintojas į laboratorijos nurodytą vietą, užtikrinant tinkamas mėginių gabenimo sąlygas. Šiuo atveju išrašomas atskiras lydraštis, nurodant, kokį pieno kokybės tyrimą atlikti.

Už šiuos papildomuosius tyrimus, pieno mėginių paruošimo šiems tyrimams ir jų pristatymo į laboratoriją, tiriamų pieno mėginių taros, konservantų išlaidas apmoka supirkėjas.

9. Už tyrimus, išskyrus privalomuosius, pagal Žemės ūkio ministro patvirtintus įkainius lygiomis dalimis moka gamintojai ir supirkėjai, išskyrus šio taisyklių priedo 4 ir 8 punktuose numatytus atvejus.

10. Už konteinerius moka gamintojai, o už konservantą ir vienkartinius pieno mėginių indelius – supirkėjai, išskyrus šio taisyklių priedo 4 ir 8 punktuose punkte numatytus atvejus.

INHIBITORINIŲ (SLOPINANČIŲJŲ) MEDŽIAGŲ NUSTATYMAS PIENE SPARČIAISIAIS METODAIS

I. ANTIBIOTIKŲ, TURINČIŲ BETA-LAKTAMINĮ ŽIEDĄ, NUSTATYMAS NAUDOJANT PREPARATUS *PENZYM* (SPARTUSIS METODAS)

1. Metodo esmė

Metodas pagrįstas tuo, kad naudojamas fermentas DD-karboksiptidazė, hidrolizuojanti R-*D-Ala-D-Ala* tipo sintetinius substratus ir greitai reaguojanti su beta-laktaminį žiedą turinčiais antibiotikais, sudarydama pastovų kompleksą.

Šiuo metodu galima aptikti piene nuo 0,005 iki 0,006 TV penicilino mililitre, naudojant preparatus *Penzym S*, ir daugiau kaip 0,017 TV penicilino mililitre, naudojant preparatus *Penzym*.

2. Įranga

Naudojama įprastinė ir toliau nurodyta specialioji mikrobiologijos laboratorijos įranga:

a) naudojant *Penzym* preparatus:

- termostatas, kuriame galima palaikyti $47^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą;
- pipetės, 10 μl ir 50 μl vardinio tūrio, su vienkartiniais antgaliais;
- 1 ml dozavimo švirkštas (pipetė);
- *Eppendorf* mėgintuvėliai, 1,5 ml, kūginiai, su kamšteliais;

b) naudojant *Penzym S* preparatus:

- termostatas, kuriame galima palaikyti $47^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą;
- pipetės, 10 μl ir 100 μl vardinio tūrio, su vienkartiniais antgaliais;
- 1 ml dozavimo švirkštas (pipetė);
- *Eppendorf* mėgintuvėliai, 1,5 ml, kūginiai, su kamšteliais.

3. Medžiagos

Penzym ar *Penzym S* rinkinys (*UCB-Bioproducts* firmos, Belgija), kuriame yra:

- a) buteliukas su fermentu DD-karboksiptidaze (toliau – reagentas Nr. 1);
- b) buteliukas su tabletėmis, kurias sudaro visi kiti būtini reagentai (toliau – reagentas Nr. 2);
- c) pincetas;
- d) spalvų skalė, atitinkanti *Penzym* ar *Penzym S* rinkinį.

PASTABA. Reagentą Nr. 1 ir reagentą Nr. 2 galima laikyti 12 mėn. 4°C temperatūroje tamsoje.

4. Pasiruošimas tyrimui

Tyrimui naudojamas *UCB-Bioproducts* firmos (Belgija) fermentas DD-karboksiptidazė. Prieš naudojimą į buteliuką su liofilizuotu fermentu (reagentas Nr. 1) įpilama 1 ml šalto sterilaus distiliuoto vandens. Rekomenduojama sterilų distiliuotą vandenį pilti švirkštu per guminį kamštuką ir sumaišyti neplakant. Fermento tirpalą galima laikyti 1 mėn. tamsoje, 4°C temperatūroje.

PASTABA. Rekomenduojama buteliuką su reagentu Nr. 2, išėmus iš šaldytuvo, keletą minučių palaikyti kambario temperatūroje, kad buteliuke nesikondensuotų drėgmė.

5. Tyrimo eiga

Tiriama saugant nuo tiesioginių saulės spindulių.

5.1. Tyrimas naudojant preparatus *Penzym*

Į *Eppendorf* mėgintuvėlius įpilama 10 μl reagento Nr. 1 ir 50 μl tiriamojo pieno, mėgintuvėliai sukamai papurtomi, kad jų turinys susimaišytų arba sumaišoma purtant mechaniniu maišytuvu. Neužkimšti mėgintuvėliai laikomi 5 min. termostate ar vandens vonelėje $47^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tuo tarpu pasiruošiama kitam etapui: po vieną tabletę reagento Nr. 2 pincetu įdedama į kiekvieną termostate ar vandens vonelėje laikomo mėgintuvėlio kamštelį. Praėjus 5 min. mėgintuvėliai užkemšami kamšteliais, tabletės sukrenta į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai atsargiai supurtomi, kad tabletės nusileistų ant dugno. Po to užkimšti mėgintuvėliai laikomi 8 min. termostate

ar vandens vonelėje $47^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ištrauktų iš termostato ar vandens vonelės mėginių negalima laikyti ilgiau kaip 15 sek.

5.2. Tyrimas naudojant preparatus *Penzym S*

Į *Eppendorf* mėgintuvėlius įpilama 10 μl reagento Nr. 1 ir 100 μl tiriamojo pieno, mėgintuvėliai sukamai papurtomi, kad jų turinys susimaišytų arba sumaišoma purtant mechaniniu maišytuvu. Neužkimšti mėgintuvėliai laikomi 7,5 min. termostate ar vandens vonelėje $47^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tuo tarpu pasiruošiama kitam etapui: po vieną tabletę reagento Nr. 2 pincetu įdedama į kiekvieną termostate ar vandens vonelėje laikomo mėgintuvėlio kamštelį. Praėjus 7,5 min. mėgintuvėliai užkemšami kamšteliais, tabletės sukrenta į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai atsargiai supurtomi, kad tabletės nusileistų ant dugno. Po to užkimšti mėgintuvėliai laikomi 15 min. termostate ar vandens vonelėje $47^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ištrauktų iš termostato ar vandens vonelės mėginių negalima laikyti ilgiau kaip 15 sek.

6. Rezultatų vertinimas

6.1. Vertinimas, kai tyrimui buvo naudoti preparatai *Penzym*

Pirmą kartą vertinama, praėjus 8 min. nuo tabletės įdėjimo į mėgintuvėlį.

Kai tabletės spalva rausva, panaši į persikų ar rausvai oranžinė, tiriamajame piene nėra antibiotikų.

Kai dominuoja geltoni tonai (tarp persikų ir geltonos spalvos) – tiriamajame piene gali būti antibiotikų, tada mėginiai papildomai laikomi termostate ar vandens vonelėje dar 7 min. Išėmus mėgintuvėlius su mėginiais iš termostato ar vandens vonelės, tuoj pat vertinama spalva aplink tabletę, lyginant su spalvų skale (3 punkto d papunktis).

Kai spalva rausvai oranžinė (pirmas skalės langelis) – tiriamajame piene nėra antibiotikų (mažiau kaip 0,005 TV penicilino mililitre).

Kai spalva yra panaši į persikų (antras skalės langelis) – įtariama, kad tiriamajame piene yra antibiotikų (apie 0,008 TV penicilino mililitre).

Kai spalva geltona (trečias skalės langelis) – tiriamajame piene yra antibiotikų (daugiau kaip 0,017 TV penicilino mililitre).

6.2. Vertinimas, kai tyrimui buvo naudoti *Penzym S* preparatai

Išėmus mėgintuvėlius su mėginiais iš termostato ar vandens vonelės, tuoj pat vertinama spalva aplink tabletę, lyginant su spalvų skale (3 punkto d dalis).

Kai spalva yra persikų – oranžinė (pirmas skalės langelis) – tiriamajame piene nėra antibiotikų (mažiau kaip 0,0025 TV penicilino mililitre).

Kai spalva yra geltonai oranžinė (antras skalės langelis) – tiriamajame piene yra antibiotikų (nuo 0,005 TV iki 0,006 TV penicilino mililitre).

Kai spalva yra geltona (trečias skalės langelis) – tiriamajame piene taip pat yra antibiotikų (daugiau kaip 0,0064 TV penicilino mililitre).

PASTABA. Tiriami ir rezultatai vertinami pagal gamintojo (*UCB-Bioproducts* firmos, Belgija) nurodymus, naudojantis gamintojo pridėtomis spalvų skalėmis *Penzym* ir *Penzym S* rinkiniuose.

II. ANTIBIOTIKŲ, TURINČIŲ BETA-LAKTAMINĮ ŽIEDĄ, NUSTATYMAS NAUDOJANT PREPARATUS *BETA STAR* (SPARTUSIS METODAS)

BetaStar 25 skirtas 25, o *BetaStar 100* – 100 pieno mėginių tirti.

7. Metodo esmė

Metodas pagrįstas specifine beta-laktaminį žiedą turinčių antibiotikų receptoriaus, susijungusio su aukso dalelėmis, ir šių antibiotikų, esančių piene, sąveika. Pirmajame etape, inkubuojant nurodytą receptoriaus kiekį su pienu, turinčiu antibiotikų, įvyksta antibiotikų sąveika su receptoriaus. Antrajame etape chromatografinė indikacinė juostelė nustatoma, ar tokia sąveika buvo. Ant juostelės esantis biomolekulių ruoželis sustabdo receptoriaus molekules, kurių neužblokavo antibiotikai, ir suformuoja pirmąją (apatinę) raudoną liniją. Antroji raudona linija yra kontrolinė, palyginamoji. Jeigu antibiotikai užblokuoja visus receptorius, tai pirmoji raudona linija

nesusiformuoja, o tai rodo, jog beta-laktaminį žiedą turinčių antibiotikų kiekis tiriamajame piene yra lygus arba didesnis kaip minimali jų aptikimo šiuo metodu riba.

Šiuo metodu galima aptikti mililitre piene $0,003 \pm 0,001$ TV penicilino ir firmos gamintojos nurodytus kitų antibiotikų kiekius.

8. Įranga

Naudojama įprastinė ir toliau nurodyta specialioji mikrobiologijos laboratorijos įranga:

a) naudojant preparatus *BetaStar 25*

– termostatas, kuriame galima palaikyti $47,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą;

b) naudojant preparatus *BetaStar 100*

– termostatas, kuriame galima palaikyti $47,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą;

– pipetės, 25 μl 100 μl ir 1350 μl vardinio tūrio, su vienkartiniais antgaliais; -*Eppendorf* mėgintuvėliai, 1,5 ml, kūginiai, su kamšteliais.

9. Medžiagos

BetaStar 25 testo rinkinį (*UCB-Bioproducts* firmos, Belgija) sudaro:

a) 25 buteliukai su liofilizuotu receptoriumi;

b) 25 vienkartiniai švirkšto antgaliai;

c) 25 indikacinės juostelės;

d) automatinis dozavimo švirkštas 0,2 ml tūriui matuoti. *BetaStar 100* testo rinkinį (*UCB-Bioproducts* firmos, Belgija) sudaro:

a) 2 buteliukai su liofilizuotu receptoriumi (vienas buteliukas skirtas 50 pieno mėginių);

b) 4 indeliai su 25 indikacinėmis juostelėmis kiekviename.

10. Pasiruošimas tyrimui

BetaStar 25 testui pasiruošimo nereikia.

BetaStar 100 testo rinkinyje esančio sublimacinio džiovinimo būdu pagaminti receptoriaus milteliai prieš naudojimą turi būti ištirpinti vandenyje. Gautas tirpalas iš vieno buteliuko turi būti išpilstytas į 50 kūginių *Eppendorf* mėgintuvėlių ir sunaudotas per vieną dieną, kai tirpalas laikomas nuo 2°C iki 8°C temperatūroje, arba per 5 dienas, kai tirpalas sušaldomas ir laikomas šaldyklnėje. Prieš ruošiant tirpalą buteliukas su receptoriumi supurtomas, nuimama plomba ir guminis kamštelis. Pipete į buteliuką įpilama 1350 μl šalto distiliuoto vandens, jis užkemšamas guminiu kamščiu ir pamažu pasukiojamas, kad ištirtų milteliai. Gautas tirpalas išpilstomas po 25 μl į kūginius *Eppendorf* mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai užkemšami ir iki naudojimo laikomi šaltai.

11. Tyrimo eiga

11.1. Tyrimas naudojant preparatus *BetaStar 25*

Iš šaldytuvo išimama dėžutė, paimamas buteliukas su receptoriumi ir atsargiai supurtoma, nuimama plomba bei guminis kamštelis.

Vienkartinis antgalis uždedamas ant švirkšto. Švirkšto stūmoklis įstumiamas iki galo, antgalis įmerkiamas 1 cm į tiriamąjį pieną, stūmoklis lėtai atleidžiamas. Paimtas 0,2 ml pieno mėginys švirkštu suleidžiamas į buteliuką. Buteliukas užkemšamas guminiu kamščiu, atsargiai pamažu pasukiojamas, kol ištirps sausosios medžiagos. Laikoma 3 min. $47,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Sausomis, švariomis rankomis atidengiamas indelis su chromatografinėmis indikacinėmis juostelėmis. Laikant už mėlynos galo paimama viena indikacinė juostelė ir įmerkiama į tiriamąjį pieną buteliuke. Ant indikacinės juostelės esančios rodyklės turi būti nukreiptos į buteliuko dugną. Laikoma 2 min. $47,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Indikacinė juostelė išimama, ir analizuojami tyrimo rezultatai.

11.2. Tyrimas naudojant preparatus *BetaStar 100*

Į kūginį *Eppendorf* mėgintuvėlį su receptoriaus tirpalu (4.18.7.4 p.) pipete įpilama 100 μl tiriamojo pieno, išmaišoma ir laikoma 3 min. $47,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Sausomis, švariomis rankomis atidengiamas indelis su chromatografinėmis indikacinėmis juostelėmis. Laikant už mėlynos galo paimama viena indikacinė juostelė ir įmerkiama į tiriamąjį pieną mėgintuvėlyje. Ant indikacinės juostelės esančios rodyklės turi būti nukreiptos į mėgintuvėlio dugną. Laikoma 2 min. $47,5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Indikacinė juostelė išimama ir analizuojami tyrimo rezultatai.

12. Rezultatų vertinimas

Kai pirmoji (apatinė) raudona linija ant indikacinės juostelės yra ryškesnė už antrąją (palyginamąją), testas laikomas neigiamu, t. y. tiriamajame pieno mėginyje antibiotikų nėra.

Kai pirmoji linija yra panaši arba mažiau ryški lyginant su antrąja, tai reiškia, kad tiriamajame pieno mėginyje antibiotikų yra, bet jų kiekis ne didesnis kaip minimali jų aptikimo šiuo testu riba.

Kai pirmosios linijos nėra, testas laikomas teigiamu, – antibiotikų kiekis lygus arba didesnis kaip minimali jų aptikimo šiuo testu riba.

Kai ant indikacinės juostelės nėra nė vienos raudonos linijos, testas laikomas negaliojančiu.

III. ANTIBIOTIKŲ NUSTATYMAS NAUDOJANT SNAP TESTUS (SPARTUSIS METODAS)

13. Antibiotikams nustatyti gali būti naudojami trys skirtingi *SNAP* testai: beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams, tetraciklinams ir gentamicinui. Testai vartojami antibiotikams nustatyti žaliame maišytame karvių piene. Mėginiai turi būti atšaldyti ir ištirti per 3 dienas po jų surinkimo. Pieno mėginys prieš tyrimą kruopščiai sumaišomas. Metodas netinka pienui, kuris pagal spalvą ir konsistenciją neatitinka šių taisyklių 13 punkte nurodytų reikalavimų.

14. Metodo esmė

Visų *SNAP* testų veikimo principas yra konkurentinė imunofermentinė reakcija. Metodas pagrįstas tuo, kad naudojamas konjugatas (antibiotikus surišantys receptoriniai baltymai, konjuguoti su fermentu – krienų peroksidaze), kuris prijungia piene esančius tiriamus antibiotikus, sudarydamas stabilius kompleksus. Šis procesas įvyksta pirmajame tyrimo etape, įpylus pieną į mėgintuvėlį su konjugatu. Jei piene nėra antibiotikų, nesurištas į kompleksus konjugatas antrajame tyrimo etape rišasi prie antibiotikų, esančių *SNAP* prietaiso mėginio duobutėje, ir ten sudaro kompleksus (tamsiai mėlyna spalva). Tačiau, jei piene buvo antibiotikų, jau mėgintuvėlyje surištas į kompleksus konjugatas grįžtamosios srovės (nuspaudus aktyvatorių) yra išplaunamas iš mėginio duobutės (šviesiai mėlyna spalva).

SNAP testų jautrumas atitinka didžiausius leistinus arba šiek tiek mažesnius antibiotikų likučių piene kiekius. *SNAP* beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams nustatyti skirtais rinkiniais piene galima aptikti 0,004 µg penicilino G mililitre. Be to, šie testai nustato ir kitus beta-laktaminį žiedą turinčius antibiotikus: ampiciliną (0,004 µg/ml), amoksiciliną (0,004 µg/ml), cefapiriną (0,004 µg/ml), cefiofurą (0,006 µg/ml), kloksaciliną (0,030 µg/ml), dikloksaciliną (0,025 µg/ml). *SNAP* tetraciklinų testais galima aptikti 0,020 µg tetraciklino mililitre, 0,030 µg chlortetraciklino mililitre ir 0,030 µg oksitetraciklino mililitre; *SNAP* gentamicino testais – 0,030 µg gentamicino mililitre.

15. Įranga

Naudojama įprastinė mikrobiologijos laboratorijos įranga ir žemiau nurodyta specialioji:

– mėgintuvėlių šildytuvas, termostatas ar vandens vonelė, kurioje palaikoma $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ temperatūra;

– mėgintuvėlių stovas;

– šaldytuvas, kuriame palaikoma nuo 0°C iki 7°C temperatūra.

PASTABA. Tiriant patartina naudoti šildytuvą, sukurtą specialiai *SNAP* testui (*IDEXX Laboratories, Inc.* firmos, JAV). Naudojant šį šildytuvą nereikia jokios papildomos įrangos, išskyrus šaldytuvą testams laikyti. Šildytuvas gali būti naudojamas ir pienevežyje.

16. Medžiagos

SNAP testo rinkinys (*IDEXX Laboratories, Inc.*, JAV), kuriame yra:

a) mėgintuvėlis su konjugatu;

b) *SNAP* prietaisas;

c) pipetė.

PASTABA. Visos medžiagos laikomos nuo 0°C iki 7°C temperatūroje ne ilgiau kaip 12 mėn. (tetraciklinams nustatyti – 9 mėn.). Prieš vartojimą testo rinkiniai gali būti laikomi nuo 18°C

iki 29°C temperatūroje. Nesuvaruoti tyrimo metu testai turi būti vėl padedami į šaldytuvą.

17. Pasiruošimas tirti

Prieš tyrimą patikrinama, ar mėgintuvėlių šildytuvas (vandens vonelė) rodo $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą.

Iš maišelio išimamas SNAP prietaisas, pipetė ir mėgintuvėlis su konjugatu. Naujo SNAP prietaiso dėmės rezultatų laukelyje ir aktyvacijos apskritimas turi būti šviesiai mėlynos spalvos. Patikrinama, ar konjugato milteliai yra mėgintuvėlio dugne. Priešingu atveju mėgintuvėlis lengvai pakratomas, kad milteliai nukristų į dugną.

18. Tyrimo eiga

SNAP prietaisas uždedamas ant šildytuvo arba įdedamas į termostatą. Pieno mėginys kruopščiai supurtomas. SNAP prietaisas viso tyrimo metu turi būti horizontalioje padėtyje.

1-asis etapas. Pieno mėginys prieš tyrimą sumaišomas. Mėgintuvėlio su konjugatu dangtelis nuimamas. Iš mėginio taros vidurio pipete įtraukiama tiriamojo pieno be oro burbuliukų ($450 \mu\text{l} \pm 50 \mu\text{l}$) iki pipetės indikacinės linijos. Mėgintuvėlis pasukiojamas, kad piene ištirtų konjugatas, įstatomas į specialią įdubą mėgintuvėlių šildytuve (ar stovėlį termostate) ir laikomas 5 min. $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje (nustatant beta-laktamus). Negalima šildyti ilgiau kaip 6 min. Naudojant tetraciklinų ir gentamicino nustatymo SNAP rinkinius inkubuojama 2 min. toje pačioje temperatūroje.

2-asis etapas. Pašildytas pieno mėginys su konjugatu iš mėgintuvėlio supilamas į SNAP prietaiso mėginio duobutę, mėgintuvėlis išmetamas. Stebima, kaip pieno mėginys slenka per rezultatų laukelį iki mėlyno aktyvacijos apskritimo (tai trunka vidutiniškai apie 30 sek., bet ne ilgiau kaip 1 min.).

3-iasis etapas. Kai aktyvacijos apskritimas ima blukti, nuspaudžiamas SNAP testo aktyvatorius, nelaukiant kol spalva visiškai išnyks. SNAP prietaisas turi būti ant šildytuvo tol, kol išryškės spalva. Beta-laktamų tyrimo rezultatai (kontrolinės ir mėginio dėmės spalva) vizualiai vertinami po 4 min. Spalvos išlieka stabilios 15 min. Tetraciklinų ir gentamicino tyrimų rezultatai vertinami po 7 min. Spalvos išlieka stabilios dar 5 min. Visų trijų testų bendras atlikimo laikas – 9 min.

PASTABA. Naudojant specialų SNAP STOP tirpalą (IDEXX Laboratories, Inc. firmos, JAV, 200 testų, vartojimo laikas – 1 metai), spalvos išlieka stabilios 1 val.

19. Rezultatų vertinimas

Vertinant rezultatus SNAP prietaisas padedamas taip, kad mėginio duobutė būtų kairėje pusėje, o nuspaustas aktyvatorius -dešinėje. Taip padėjus SNAP prietaisą kontrolinė dėmė rezultatų laukelyje visada bus viršuje, o mėginio dėmė – apačioje.

Kai mėginio dėmė tamsesnė už kontrolinę, tiriamajame piene nėra antibiotikų (penicilino mažiau kaip 0,004 TV/ml, tetraciklinų mažiau kaip nuo 0,020 $\mu\text{g/ml}$ iki 0,030 $\mu\text{g/ml}$, gentamicino mažiau kaip 0,030 $\mu\text{g/ml}$).

Kai mėginio dėmė šviesesnė už kontrolinę ar tokios pat spalvos, tiriamajame piene yra antibiotikų (penicilino daugiau kaip 0,004 TV/ml, tetraciklinų daugiau kaip nuo 0,020 $\mu\text{g/ml}$ iki 0,030 $\mu\text{g/ml}$ gentamicino daugiau kaip 0,030 $\mu\text{g/ml}$).

PASTABA Tyrimo rezultatų automatiniam vertinimui galima naudoti prietaisą SNAP Image Reader (IDEXX Laboratories, Inc. JAV).

20. Teigiamų tyrimo rezultatų, gautų SNAP beta-laktamų testais, patvirtinimas

Kai tiriamajame piene rasta antibiotikų, rezultatams patvirtinti gali būti atliekamas pakartotinis tyrimas.

Pakartotinai tiriama naudojant keturis SNAP prietaisus – du tiriamajam pieno mėginiui, vieną – teigiamai kontrolei, antrą -neigiamai kontrolei.

Teigiama kontrolė – etaloninis penicilino G tirpalas, ruošiamas vartojant IDEXX Laboratories, Inc. (JAV) preparatą. Penicilino G preparatų rinkinį sudaro 50 buteliukų, skirtų 100 tyrimų. Buteliukai laikomi šaldytuve arba kambario temperatūroje (nuo 0°C iki 30°C). Prieš vartojimą į buteliuką įpilamas 1 ml žalio maišyto pieno be inhibitorių (užtenka dviems tyrimams). Palaikoma 10 min. ir sumaišoma, atsargiai apverčiant 10 kartų. Gautame tirpale – 0,005 $\mu\text{g/ml}$

penicilino G.

Teigiama kontrolė vartojama įtariamiesiems teigiamiesiems rezultatams patvirtinti, naujai *SNAP* prietaisų partijai ir tyrėjo pasiruošimui patikrinti.

Neigiama kontrolė – pienas be inhibitorių.

Pakartotinio tyrimo rezultatai vertinami taip:

– jeigu *teigiama* kontrolė rodo, kad antibiotikų rasta, *neigiama* kontrolė – antibiotikų nerasta, o vienas ar abu tiriamojo pieno mėginiai – teigiami, laikoma, kad tiriamajame piene antibiotikų rasta.

IV. ANTIBIOTIKŲ NUSTATYMAS NAUDOJANT ROSA TESTUS (SPARTUSIS METODAS)

Antibiotikams nustatyti gali būti vartojami keturi skirtingi ROSA (Rapid One Step Assay) testai: beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams (*Charm MRL™ Beta-lactam Test*), tetraciklinams (*Charm ROSA™ Tetracycline Test*), sulfametazinui (*Charm ROSA™ Sulfamethazine Test*) ir sulfadimetoksiniui su sulfametazinu (*Charm SDSM ROSA™ Test for Sulfadimetoxine and Sulfamethazine*). Neigiami testo rezultatai laikomi patikimais, o teigiami rezultatai, gauti taikant šį metodą, turi būti patvirtinti pakartotiniu tyrimu kartu su *teigiama* ir *neigiama* kontrole arba metodu, nurodytu 1991 m. vasario 14 d. Komisijos sprendime 91/180/EEB, nustatančiame tam tikrus žalio ir termiškai apdoroto pieno tyrimų ir analizės metodus, arba to metodo analogais.

Testai vartojami antibiotikams nustatyti žaliame maišytame karvių piene. Mėginiai turi būti atšaldyti nuo 0°C iki 7°C ir ištirti per 5 dienas po jų surinkimo. Pieno mėginys prieš tyrimą kruopščiai išmaišomas. Metodas netinka pienui su pastebimomis baltymų nuosėdomis.

21. Metodo esmė

Visų ROSA testų veikimo principas yra konkurentinė receptorinė reakcija.

Pienas teka chromatografinę testo juostelę, ir, jeigu jame nėra ieškomų medžiagų, atitinkamoje vietoje išryškėja T (testo) linija. Jeigu ieškomų medžiagų yra, susidaro mažesnio intensyvumo linija. T (testo) linija lyginama su C (kontrolės), kuri parodo artimą didžiausiam leistinam likučių kiekiui koncentraciją.

ROSA testų jautrumas atitinka didžiausius leistinus arba šiek tiek mažesnius antibiotikų likučius piene. Beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams nustatyti skirtu specialiai Europos Sąjungos rinkai *Charm MRL™ Beta-lactam Test* (penicilino testu) piene galima aptikti 0,004 µg penicilino G mililitre. Taip pat šis testas reaguoja su kitais beta-laktaminį žiedą turinčiais antibiotikais: amoksicilinu, ampicilinu, cefazolinu, ceftiofuru ir jo metabolitu, cefchinomu, cefaloniumu, cefapirinu, kloksacilinu, dikloksacilinu, oksacilinu, nafcilinu. *Charm ROSA™ Tetracycline Test* (tetraciklinų testais) galima aptikti nuo 0,015 µg iki 0,020 µg tetraciklino mililitre, nuo 0,070 µg iki 0,100 µg chlortetraciklino mililitre ir nuo 0,070 µg iki 0,100 µg oksitetraciklino mililitre; *Charm ROSA™ Sulfamethazine Test* (sulfametazino testais) – 0,008 µg sulfametazino mililitre, *Charm SDSM ROSA™ Test for Sulfadimetoxine and Sulfamethazine* (sulfadimetoksino ir sulfametazino testais) – 0,006 µg sulfadimetoksino mililitre ir 0,008 µg sulfametazino.

22. Įranga

– testo juostelių šildytuvas, kuris palaiko 56°C ± 1°C temperatūrą ir turi laikmatį, pranešantį apie inkubavimo pabaigą;

– šaldytuvas (nuo 0°C iki 7°C);

– šaldyklė (minus 15°C);

– automatinė pipetė su vienkartiniais 300 µl antgaliais;

– portatyvus testų skaitytuvas, kurį tiekia *Charm Sciences Inc.* firma, JAV.

23. Medžiagos

– ROSA testo juostelės (*Charm Sciences Inc.* firma, JAV);

– pipetės (300 µl) pienui įpilti (vietoje jų galima vartoti automatinę pipetę su vienkartiniais 300 µl antgaliais);

– penicilino G tabletės (arba kitos etaloninės medžiagos kitos rūšies testams) 0,004 µg

penicilino G mililitre tirpalo *teigiamai* kontrolei paruošti.

PASTABA. Testo juostelės ir kontrolinės medžiagos laikomos nuo 0°C iki 7°C temperatūroje. Prieš vartojimą testo juostelės parą (pageidautina trumpiau) gali būti laikomos kambario (nuo 18°C iki 29°C) temperatūroje. Nepanaudotos tyrimo metu testo juostelės vėl padedamos į šaldytuvą.

24. Pasiruošimas tyrimui

Prieš tyrimą patikrinama, ar testų šildytuve yra 56°C ± 1°C temperatūra.

25. Tyrimo eiga

ROSA testo juostelė pažymima. Tada atidaromas šildytuvas ir juostelė įdedama į jai skirtą vietą plokščiąja puse į viršų. Plėvelė ant juostelės iš vieno krašto atsargiai atlenkiama iki mėlynos juostos. Pipete suleidžiama 300 µl ± 15 µl tiriamojo pieno. Plėvelė užlenkiama, šildytuvas uždaromas. Automatiškai įsijungia laikmatis. Pasibaigus inkubavimo trukmei (po 8-10 min.), kol skamba garso ir mirksi šviesos signalas, testo juostelė išimama iš šildytuvo, ir jis uždaromas.

26. Rezultatų vertinimas

Juostelė laikoma nukreipus žemyn. Jeigu yra pašalinių medžiagų (pieno, pieno miltelių, dulkių ir t. t.), jos visos atsargiai nuvalomos nuo juostelės. Apžiūrint vertinamos C (kontrolės) ir T (testo) linijos. Jeigu kontrolės linija neišryškėjo, yra trūkinėjanti arba pienas dengia C arba T linijas, tyrimas laikomas negaliojančiu, ir jį reikia pakartoti.

Jei T (testo) linija tamsesnė, ryškesnė už C (kontrolės), tiriamajame piene nėra ieškomų antibiotikų. Kai T (testo) linija šviesesnė už kontrolinę ar tokios pat spalvos, tiriamajame piene gali būti ieškomų antibiotikų (penicilino daugiau kaip 0,004 µg/ml, tetraciklinų daugiau kaip nuo 0,020 µg/ml iki 0,030 µg/ml ir t. t.).

Laikant juosteles, neigiami rezultatai mažai kinta, o teigiami išryškėja. Išryškintos juostelės kambario temperatūroje išlieka patikimai nepakitusios 10 min, šaldytuve (nuo 0°C iki 7°C) – 1 val., šaldyklėje (minus 15°C ir žemesnėje) – 1 savaitę.

PASTABA. Tyrimo rezultatų skaitmeniniam vertinimui ir duomenų išsaugojimui galima naudoti prietaisą *ROSA Reader* (*Charm Sciences Inc.* firmos, JAV) arba *Imager* ir *LUM-T* (*Charm Sciences Inc.* firmos, JAV).

V. ANTIBIOTIKŲ, TURINČIŲ BETA-LAKTAMINĮ ŽIEDĄ, NUSTATYMAS NAUDOJANT *CHARM II* SISTEMĄ (SPARTUSIS METODAS)

27. Metodo esmė

CHARM II sistema remiasi radioreceptoriniu principu. Testas skirtas beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams nustatyti žaliame maišytame karvių piene.

CHARM II sistemos jautrumas beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams parodytas 1 lentelėje.

1 lentelė

Antibiotiko pavadinimas	ES didžiausi leistini antibiotikų likučių kiekiai, µg/kg (angl. MRL – Maximum Residue Limits)	<i>Charm II</i> sistemos metodo jautrumas, antibiotiko µg/kg
Amoksicilinas	4	5
Ampicilinas	4	4
Cefazolinas	50	15
Ceftiofuras + metabolitai	100	40
Cefchinomas	20	20
Cefapirinas	60	3
Kloksacilinas	30	30
Dikloksacilinas	30	20
Nafcilinas	30	30
Oksacilinas	30	30
Penetamatas	4	2
Penicilinas G	4	2

PASTABA Testų jautrumas nustatytas statistiškai apskaičiuojant, kokia antibiotiko

koncentracija duoda 90% teigiamų rezultatų.

Testui vartojami specifiniai bakteriniai receptoriai, nustatyti beta-laktaminį žiedą turinčius antibiotikus. Taip pat į pieno mėginį dedama radioaktyviu izotopu žymėtos medžiagos, pagal struktūrą ir biologinį veikimą panašios į ieškomą antibiotiką. Beta-laktaminį žiedą turintiems antibiotikams nustatyti vartojamas ^{14}C izotopu žymėtasis penicilinas. Jei tiriamajame pieno mėginyje yra kurio nors beta-laktaminį žiedą turinčio antibiotiko, jis konkuruoja su žymėtuoju penicilinu dėl receptorių surišimo vietų. Scinciliacijos/ liuminescencijos skaitikliu nustatomas surišto žymėtojo ^{14}C izotopu penicilino kiekis, kuris lyginamas su *kontrolinio* taško verte. Kuo didesnis žymėtojo penicilino kiekis nustatomas, tuo mažiau tiriamame mėginyje beta-laktaminį žiedą turinčių antibiotikų, kuo mažesnis – tuo daugiau.

PASTABA. Kompanijos „*Charm Sciences Inc.*“ tiekiamose medžiagose ^{14}C izotopo yra labai mažai. Nereikalingos sausos medžiagos gali būti išmestos į bendrą atliekų konteinerį, neženklinant radioaktyviųjų atliekų ženklu. Skystos atliekos gali būti išpiltos į bendrą kanalizaciją, užpilant vandeniu.

28. Įranga

Įranga, esanti komplekte:

- scinciliacijos/liuminescencijos skaitiklis, modelis 6600 (*Charm Sciences Inc.*, JAV);
- 13 mm × 16 mm borosilikato stiklo mėgintuvėliai su plastikiniais kamšteliais;
- medvilniniai tamponėliai;
- 5 ml pipetė;
- 300 μl pipetė;
- mėgintuvėlių šildytuvas, kuriame palaikoma nuo 63°C iki 67°C temperatūra;
- mėgintuvėlių centrifuga (1200 g);
- mėgintuvėlių purtyklė (*Vortex*).

Įranga, kurios nėra komplekte (galima įsigyti iš *Charm Sciences Inc.*, JAV):

- mėgintuvėlių žymeklis, atliekų konteineris ir tablečių išėmiklis;
- graduotas cilindras, 100 ml vardinio tūrio;
- stiklinis termometras, padalos vertė 0,5°C;
- mėgintuvėlių stovas, dvylikai vienetų.

29. Medžiagos ir reagentai

Charm II sistemos rinkinys (*Charm Sciences Inc.*, JAV), kuriame yra:

– geltonos spalvos ^{14}C žymėtojo penicilino tabletės, supakuotos po vieną (kiekviena geltona tabletė turi 0,15 kilobekerelių (kBq));

– žalios spalvos bakterinių receptorių tabletės, supakuotos po vieną;

– scinciliacijos skystis „Opti-Fluor“ reikalingas tam, kad būtų galima išmatuoti su bakteriniais receptoriais surišto ^{14}C izotopu žymėtojo penicilino kiekį. ^{14}C izotopo išspinduliuojami gama kvantai „Opti-Fluor“ transformuojami į matomos šviesos impulsus, kurie ir registruojami scinciliacijos/liuminescencijos skaitiklyje;

– penicilino G etalonas 4,5 ppb (0,008 TV/ml) – *teigiamai* kontrolei paruošti. Prieš naudojimą etalonas ištirpinamas 100 ml pasterizuoto pieno, be beta-laktaminį žiedą turinčių antibiotikų. Tam galima vartoti ir *neigiamą* kontrolę. Ištirpintas etalonas gerai supurtomas, įstatomas į indą su ledais ir palaikomas apie 15 min. prieš tyrimą;

– pieno milteliai, pagaminti iš pieno be inhibitorių, skirti *neigiamai* kontrolei paruošti. Prieš vartojimą milteliai ištirpinami 100 ml 37°C temperatūros distiliuoto ar dejonizuoto vandens. *Neigiamai* kontrolei galima naudoti žalią arba pasterizuotą pieną, kurio beta-laktaminį žiedą turinčių antibiotikų kiekis, apskaičiavus 3-jų matavimų vidurkį, atitinka *neigiamos* kontrolės vertę $\pm 10\%$. Ištirpintas etalonas gerai supurtomas, įstatomas į indą su ledais ir palaikomas apie 15 min. prieš tyrimą.

Reagentai laikomi:

– geltonos ir žalios tabletės laikomos minus 15°C arba žemesnėje temperatūroje. Iš šaldyklės reikia išimti tiek tablečių, kiek bus suvartota per vieną dieną. Tabletės kambario temperatūroje gali būti laikomos iki 12 val.;

- scinciliacijos skystis „Opti-Fluor“ laikomas kambario temperatūroje;
- sausas penicilino G etalonas *teigiamai* kontrolei paruošti laikomas nuo 0°C iki 4,4°C temperatūroje. Ištirpintas etalonas gali būti laikomas 2 dienas nuo 0°C iki 4,4°C temperatūroje. Išpilsčius po 6 ml į mikromėgintuvėlius ir sušaldžius (minus 15°C temperatūroje), etalonas gali būti laikomas 2 mėn. Etalonas turi būti sušaldomas per 6 val. po ištirpinimo. Norint atšildyti etaloną, jis palaikomas po tekančio šilto vandens srove, supurtomas ir patikrinamas, ar nesusidarė nuosėdų. Atšildytas etalonas laikomas nuo 0°C iki 4,4°C temperatūroje ir turi būti sunaudotas per 24 val.;

PASTABA Pakartotinai sušaldyti negalima.

- pieno milteliai, skirti *neigiamai* kontrolei paruošti, laikomi nuo 0°C iki 4,4°C temperatūroje. Ištirpintas *neigiamos* kontrolės etalonas gali būti laikomas 3 dienas nuo 0°C iki 4,4°C temperatūroje. Sušaldžius (minus 15°C) etalonas gali būti laikomas 2 mėn.

30. Pasiruošimas tirti

30.1. Mėginių ėmimas.

Mėginių ėmimas – labai svarbi tyrimo dalis. Būtina užtikrinti, kad laboratoriją pasiektų nepažeisti ir nesukeisti pieno mėginiai. Pieno mėginys turi būti ištirtas per 5 dienas po melžimo (saugant sandariame indelyje nuo 0°C iki 4,4°C temperatūroje). Prieš tyrimą mėginys gerai supurtomas.

Tiriant individualių karvių pieną arba labai riebią pieną (> 5 %), patartina jį centrifuguoti 3 min. centrifuga, sukuriančia 1200 g pagreitį.

30.2. Kontrolinio taško nustatymas.

Kontrolinis taškas nustatomas 6 kartus išmatavus penicilino G etalono tirpalą (*teigiamą* kontrolę) ir apskaičiavus gautų verčių vidurkį. Vidurkis padauginamas iš 1,25 – tai ir yra *kontrolinis* taškas. Visų 6 matavimų vertės turi būti mažesnės už *kontrolinį* tašką. Jeigu matavimo vertės kitokios – visa procedūra kartojama iš naujo.

Neigiamos kontrolės matavimai atliekami 3 kartus ir apskaičiuojamas vidurkis – *nulinis* taškas. *Kontrolinis* ir *nulinis* taškai nustatomi kiekvieną kartą, gavus naujos serijos reagentus.

Kiekvieną dieną išmatuojama *teigiama* ir *neigiama* kontrolė – tokiu būdu patikrinamas analizatoriaus veikimas.

Neigiamos kontrolės vertė turi būti $\pm 20\%$ ribose, lyginant su *nuliniu* tašku.

Teigiamos kontrolės vertė turi būti mažesnė už *kontrolinio* tašką.

31. Tyrimo eiga

Mėgintuvėliai pažymimi ir į kiekvieną įdedama po žalią tabletę su bakteriniais receptoriais. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama po 300 μ l $\pm$ 100 μ l distiliuoto (dejonizuoto) vandens. Tabletės tirpinamos, įstačius mėgintuvėlį į *Vortex* purtyklę ir leidžiant tirpalui 10 kartų pakilti iki mėgintuvėlio viršaus ir nusileisti. Pieno mėginiai bei kontroliniai etalonai kruopščiai išmaišomi ir keičiant pipetės antgalius išpilstomi po 5 ml $\pm$ 0,25 ml. Pieno temperatūra turi būti nuo 0°C iki 7°C. Išmaišoma, įstačius mėgintuvėlius į *Vortex* purtyklę ir leidžiant tirpalui 10 kartų pakilti iki mėgintuvėlio viršaus ir nusileisti.

Mėgintuvėliai laikomi 2 min. nuo 63°C iki 67°C temperatūroje.

Tada mėgintuvėliai išimami iš šildytuvo, ir į kiekvieną mėgintuvėlį įdedama po geltoną tabletę. Įstačius mėgintuvėlius į *Vortex* purtyklę, leidžiama tirpalui 10 kartų pakilti iki mėgintuvėlio viršaus ir nusileisti.

ĮSPĖJIMAS. Tabletės įdėjimas ir ištirpinimas visuose mėgintuvėliuose turi užtrukti ne ilgiau kaip 40 sek.

Mėgintuvėliai laikomi 2 min. nuo 63°C iki 67°C temperatūroje.

Centrifuguojama 3 min. Išėmus mėgintuvėlį iš centrifugos, pienas nedelsiant nupilamas. Jeigu reikia, medvilnės tamponėliu suardomas riebalų žiedas.

Medvilnės tamponėliu riebalų likučiai nuvalomi nuo vidinių mėgintuvėlio sienelių. Dugne esančios nuosėdos neličiamos.

Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama po 300 μ l $\pm$ 100 μ l distiliuoto (dejonizuoto) vandens ir gerai išmaišoma *Vortex* purtyklėje, kad nuosėdos pereitų į suspensiją.

Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama 3,0 ml $\pm$ 0,5 ml scinciliacijos skysčio. Mėgintuvėlis

užkemšamas ir vartomas tol, kol tirpalas taps vienalytis.

Mėgintuvėlis įstatomas į scinciliacijos/liuminescencijos skaitiklį ir, pasirinkus ^{14}C kanalą, per 60 sek. užrašomi rezultatai (skaičius per minutę, angl. *cpm*).

32. Rezultatų vertinimas

Kontrolinis taškas yra riba tarp neigiamo ir įtariamo teigiamo rezultato.

Kai tiriamojo mėginio *cpm* vertė yra didesnė už *kontrolinį* tašką – rezultatas neigiamas.

Kai tiriamojo mėginio *cpm* vertė yra mažesnė arba lygi *kontroliniam* taškui – rezultatas teigiamas.

Įtariamas teigiamas mėginys turi būti pakartotinai ištirtas:

– jeigu tiriamo mėginio *cpm* vertė yra 50 *cpm* didesnė už *kontrolinį* tašką – tyrimas kartojamas;

– jeigu pakartojus gauta vertė yra didesnė už *kontrolinį* tašką – rezultatas neigiamas;

– jeigu pakartojus tyrimą gauta vertė yra mažesnė už *kontrolinį* tašką arba jam lygi – įtariamas teigiamas rezultatas: tyrimas kartojamas pagal 33 punktą.

33. Patvirtinimas

Įtariamai teigiami mėginiai tiriami kartu su *teigiamos* ir *neigiamos* kontrolės etalonais. Šie etalonai turi būti paruošti iš kitų reagentų buteliukų (nevirtotų *kontroliniam* ir *nuliniam* taškui nustatyti). Patvirtinimo rezultatai vertinami taip:

– *neigiama* kontrolė turi būti 20 % didesnė už *nulinį* tašką;

– *teigiama* kontrolė turi būti mažesnė už *kontrolinį* tašką.

Jeigu kontrolės atitinka visas sąlygas, o tiriamojo mėginio *cpm* vertė yra mažesnė už *kontrolinį* tašką arba jam lygi – rezultatas teigiamas.

Papildyta priedu:

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, Žin., 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

Pakeitimai:

1.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [185](#), 2002-05-15, Žin., 2002, Nr. 49-1920 (2002-05-17), i. k. 1022330ISAK00000185

Dėl 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo

2.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [190](#), 2002-05-22, Žin., 2002, Nr. 53-2094 (2002-05-29), i. k. 1022330ISAK00000190

Dėl 2002 m. gegužės 15 d. įsakymo Nr. 185 "Dėl 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo" papildymo

3.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [235](#), 2002-06-20, Žin., 2002, Nr. 63-2553 (2002-06-25), i. k. 1022330ISAK00000235

Dėl 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo

4.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [446](#), 2002-11-15, Žin., 2002, Nr. 111-4941 (2002-11-20), i. k. 1022330ISAK00000446

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo

5.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [518](#), 2002-12-24, Žin., 2002, Nr. 127-5763 (2002-12-31), i. k. 1022330ISAK00000518

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo

6.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-63](#), 2003-02-26, Žin., 2003, Nr. 22-933 (2003-02-28), i. k. 1032330ISAK0003D-63

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" ir žemės ūkio ministro 2002 m. lapkričio 20 d. įsakymo Nr. 450 "Dėl Laikinosios pieno supirkimo tvarkos taikymo" pakeitimo

7.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-216](#), 2003-05-28, Žin., 2003, Nr. 54-2414 (2003-06-04), i. k. 1032330ISAK003D-216

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo

8.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-245](#), 2003-06-20, Žin., 2003, Nr. 60-2739 (2003-06-25), i. k. 1032330ISAK003D-245

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl naujos Pieno supirkimo taisyklių redakcijos patvirtinimo" pakeitimo

9.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-346](#), 2003-08-25, Žin., 2003, Nr. 83-3814 (2003-08-29), i. k. 1032330ISAK003D-346

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

10.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-500](#), 2003-11-26, Žin., 2003, Nr. 112-5039 (2003-11-28), i. k. 1032330ISAK003D-500

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

11.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-3](#), 2004-01-08, Žin., 2004, Nr. 8-209 (2004-01-15), i. k. 1042330ISAK00003D-3

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

12.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-150](#), 2004-04-02, Žin., 2004, Nr. 52-1766 (2004-04-08), i. k. 1042330ISAK003D-150

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

13.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-203](#), 2004-04-21, Žin., 2004, Nr. 60-2153 (2004-04-24), i. k. 1042330ISAK003D-203

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

14.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-541](#), 2004-10-04, Žin., 2004, Nr. 148-5375 (2004-10-07), i. k. 1042330ISAK003D-541

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

15.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-123](#), 2005-03-08, Žin., 2005, Nr. 33-1082 (2005-03-10), i. k. 1052330ISAK003D-123

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

16.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-527](#), 2005-11-11, Žin., 2005, Nr. 135-4868 (2005-11-15), i. k. 1052330ISAK003D-527

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

17.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-1](#), 2006-01-04, Žin., 2006, Nr. 4-116 (2006-01-12), i. k. 1062330ISAK00003D-1

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo

18.

Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerija, Įsakymas

Nr. [3D-302](#), 2006-07-25, Žin., 2006, Nr. 85-3336 (2006-08-03), i. k. 1062330ISAK003D-302

Dėl žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymo Nr. 146 "Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo" pakeitimo