

II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS DIREKTIV

af 20. december 1983

om ændring af direktiv 71/393/EØF, 72/199/EØF og 78/633/EØF om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer

(84/4/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer⁽¹⁾, senest ændret ved akten vedrørende Grækenlands tiltrædelse, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

I Kommissionens direktiv 71/393/EØF⁽²⁾, 72/199/EØF⁽³⁾ og 78/633/EØF⁽⁴⁾ fastsættes metoder til bestemmelse af henholdsvis råfedt, virginiamycin og zink-bacitracin; disse metoder må erstattes med metoder, der tilpasset den videnskabelige og tekniske udvikling;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

I bilaget til direktiv 71/393/EØF erstattes del 4 »Bestemmelse af råfedt« med teksten i bilag I til nærværende direktiv.

Artikel 2

I bilag II til direktiv 72/199/EØF erstattes del 5 »Bestemmelse af virginiamycin — ved diffusion i agar-

næringssubstrat« med teksten i bilag II til nærværende direktiv.

Artikel 3

I bilaget til direktiv 78/633/EØF erstattes del 1 »Bestemmelse af zinkbacitracin — ved diffusion i agar-næringssubstrat« med teksten i bilag III til nærværende direktiv.

Artikel 4

Medlemsstaterne sætter de fornødne love og administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme dette direktiv senest den 1. juni 1984. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 5

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 20. december 1983.

På Kommissionens vegne

Poul DALSGER

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT nr. L 170 af 3. 8. 1970, s. 2.

⁽²⁾ EFT nr. L 279 af 20. 12. 1971, s. 7.

⁽³⁾ EFT nr. L 123 af 29. 5. 1972, s. 6.

⁽⁴⁾ EFT nr. L 206 af 29. 7. 1978, s. 43.

BILAG I**4. BESTEMMELSE AF RÅFEDT****1. Formål og anvendelse**

Metoden anvendes til bestemmelse af råfedtindholdet i foderstoffer. Den er ikke beregnet til analyse af olieholdige frø og olieholdige frugter som defineret i Rådets forordning 136/66/EØF af 22. september 1966.

Alt efter foderstoffets art anvendes en af de to beskrevne metoder.

1.1. Metode A

Skal anvendes til ublandede foderstoffer af vegetabilsk oprindelse med undtagelse af sådanne, som er kendt som foderstoffer, hvorfra fedt ikke kan ekstraheres fuldstændigt med petroleumsether uden forudgående hydrolyse. Blandt disse kan nævnes gluten, gær, soja- og kartoffelproteiner. Metoden anvendes endvidere til foderblandinger med undtagelse af sådanne, som indeholder mælkepulver, eller hvis fedtindhold ikke kan ekstraheres fuldstændigt med petroleumsether uden forudgående hydrolyse.

1.2. Metode B

Skal anvendes til ublandede foderstoffer af animalsk oprindelse samt til de foderstoffer, der er nævnt under punkt 1.1 som undtagelser fra metode A.

2. Princip**2.1. Metode A**

Prøven ekstraheres med petroleumsether. Opløsningsmidlet afdampes og det ekstraherede fedt tørres og vejes.

2.2. Metode B

Prøven hydrolyseres med saltsyre under kogning. Opløsningen afkøles og filtreres. Den vaskede og tørrede rest behandles herefter som beskrevet under metode A.

3. Reagenser

3.1. Petroleumsether, kogepunktsinterval : 40-60 °C. Bromtallet skal være under 1, og inddampningsresten under 2 mg/100 ml.

3.2. Natriumsulfat, vandfrit

3.3. Saltsyre, 3M.

3.4. Filtreringsmiddel, f.eks. kiselgur, Hyflo-supercel.

4. Apparatur

4.1. Ekstraktionsapparat. Dersom apparatet er udstyret med et hævertrør (Soxhlet apparat), bør varmekilden indstilles, så der sker ca. 10 tømninger i timen ; dersom apparatet ikke er udstyret med hævertrør, bør varmekilden være ca. 10 ml i minuttet.

4.2. Ekstraktionshætter skal være frit for stof, der er opløseligt i petroleumsether, og skal have en porøsitet i overensstemmelse med kravene under 4.1.

4.3. Tørreskab, enten et vakuomtørreskab indstillet til 75° C ± 3° C eller et tørreskab med luftcirkulation indstillet til 100° C ± 3° C.

5. Fremgangsmåde**5.1. Metode A (jf. 8.1)**

5 g af prøven afvejes med en nøjagtighed på 1 mg, fyldes i en ekstraktionshætte (4.2) og tildækkes med en affedtet vatprop.

Hætten anbringes i et ekstraktionsapparat (4.1), og der ekstraheres i seks timer med petroleumsether (3.1). Petroleumsetherekstraktet opsamles i en tør, tareret kolbe indeholdende nogle stykker pimpsten⁽¹⁾.

Opløsningsmidlet afdestilleres. Destillationsresten tørres derpå i halvanden time i tørreskabet (4.3). Efter afkøling ekssikator vejes resten. Ved yderligere tørring på 30 minutter kontrolleres, om fedtets vægt forbliver konstant (vægttabet mellem to på hinanden følgende vejninger skal ligge under 1 mg).

(¹) Såfremt fedtet senere skal undersøges kvalitativt, erstattes pimpstenstykkerne af glaskugler.

5.2. Metode B

2,5 g af prøven afvejes med en nøjagtighed på 1 mg (se bemærkninger 8.2), hældes i et 400 ml bægerglas eller en 300 ml konisk kolbe, hvorefter der tilsættes 100 ml 3M saltsyre (3.3) og nogle stykker pimpsten. Bægerglasset tildækkes med et urglas, eller hvis der anvendes konisk kolbe, forsynes denne med en tilbageløbskøler. Blandingen bringes til let kogning over en svag flamme eller på en varmeplade i ca. 1 time. Materialet skal forhindres i at sætte sig fast på glassets væg.

Beholderen afkøles, og der tilsættes så meget filtreringsmiddel (3.4), at der ikke opstår noget fedttab ved filtreringen. Der filtreres gennem et fugtigt, fedtfri dobbelt papirfilter. Remanensen udvaskes med koldt vand, indtil filtratet er neutralt. Derefter kontrolleres, at filtratet ikke har fedtperler på overfladen. Tilstedeværelse af fedt viser, at der inden hydrolysen skal foretages en ekstraktion af prøven med petroleumsether ved anvendelse af metode A.

Det dobbelte papirfilter med filterresten lægges på et urglas og tørres i tørreskab ved $100^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ i halvanden time.

Det dobbelte papirfilter med den tørre filterrest anbringes i en ekstraktionshætte (4.2) og tildækkes med en affedt vatprop. Hætten anbringes i et ekstraktionsapparat (4.1), hvorefter der fortsættes som beskrevet under 5.1, andet og tredje afsnit.

6. Beregning af resultaterne

Vægten af afdampningsresten udtrykkes i % af prøven.

7. Reproducerbarhed

Forskellen mellem to parallelbestemmelser udført på samme prøve af samme analytiker bør ikke overstige :

- 0,2 % i absolut værdi, for råfedtindhold under 5 %,
- 4,0 % af det højeste resultat, for indhold på 5 til 10 %,
- 0,4 % i absolut værdi, for indhold over 10 %.

8. Bemærkninger

- 8.1. Til prøver med højt fedtindhold, som er vanskelige at findele, eller som ikke egner sig til udtagning af en reduceret homogen prøve, anvendes følgende fremgangsmåde.

20 g af prøven afvejes med en nøjagtighed på 1 mg og blandes med 10 g eller mere af vandfrit natriumsulfat (3.2). Derpå ekstraheres med petroleumsether (3.1) som angivet under 5.1. Den herved opsamlede ekstrakt tilsættes petroleumsether (3.1) ad 500 ml og blandingen rystes. Af opløsningen udtages 50 ml, som hældes i en lille, tør, tareret kolbe indeholdende stykker af pimpsten⁽¹⁾. Opløsningsmidlet afdampes; derpå tørres og fortsættes som beskrevet under 5.1, sidste afsnit.

Ekstraktionsresten i hætten befries for opløsningsmidlet og findeles til en kornstørrelse på 1 mm, hvorefter den hældes tilbage i ekstraktionshætten (der tilsættes ikke natriumsulfat); derpå fortsættes som beskrevet under 5.1, andet og tredje afsnit.

Fedtindholdet beregnes som en procentdel af prøven ved anvendelse af nedenstående formel :

$$(10 a + b) \times 5$$

hvor :

- a = vægt i gram af remanensen efter den første ekstraktion (den alikvote del af ekstraktet)
- b = vægt i gram af remanensen efter den anden ekstraktion.

- 8.2. Ved prøver med lavt fedtindhold kan der anvendes en afvejning på 5 g (se 5.1).

⁽¹⁾ Såfremt fedtet senere skal undersøges kvantitativt, erstattes pimpstestykkerne af glaskugler.

BILAG II

5. BESTEMMELSE AF VIRGINIAMYCIN

— ved diffusion på agarplader —

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden anvendes til bestemmelse af virginiamycin i foderstoffer og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelsen er 2 mg/kg (2 ppm)⁽¹⁾.

2. Princip

Prøven ekstraheres med en opløsning af Tween 80 i methanol. Ekstraktet dekanteres eller centrifugeres og fortyndes. Dets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af virginiamycin i et agarsubstrat podet med *Micrococcus luteus*. Diffusionen viser sig ved dannelsen af zoner, hvori mikroorganismens vækst er hæmmet. Diameteren af disse zoner anses for at være direkte proportional med logaritmen til den antibiotiske styrke inden for de anvendte koncentrationer af antibiotikum.

3. Testorganisme : *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC) 8340, NCIB 8553

3.1. Opbevaring af stamkulturen

Micrococcus luteus podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes i 24 timer ved 30° C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4° C. Den ompodes hver anden uge.

3.2. Fremstilling af bakteriesuspension (a)

Væksten fra et skråagarglas (3.1) opslømmes med 2 til 3 ml natrium-chloridopløsning (4.3). Denne opslæmning anvendes til podning af 250 ml næringssubstrat (4.1) i en Roux-kolbe, og der inkuberes i 18 til 20 timer ved 30° C. Væksten opslømmes i 25 ml natriumchloridopløsning (4.3) og fortyndes 10 gange med samme opløsning. Opslæmningens lystransmission skal være ca. 75 pct., målt ved 650 nm mod natriumchloridopløsning (4.3) i en 1 cm celle. Opslæmningen kan opbevares ved ca. 4° C i en uge.

4. Næringssubstrater og reagenser

4.1. Nærings- og testsubstrat (b)

Kødpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gærekstrakt	3,0 g
Køekstrakt	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 til 20,0 g
Vand	1 000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering).	

4.2. Phosphatbuffer, pH 6

Kaliumhydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄	2,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	8,0 g
Vand til	1 000 ml.

4.3. Natriumchloridopløsning, 0,8 % : 8 g natriumchlorid opløses i vand, fortyndes til 1 000 ml og steriliseres.

4.4. Methanol.

4.5. Blanding af phosphatbuffer (4.2) og methanol (4.4) : 80/20 (v/v).

4.6. Opløsning af Tween 80 i methanol, 0,5 % (w/v) : 5 g Tween 80 opløses i methanol (4.4) og fortyndes til 1 000 ml.

4.7. Standardpræparat : virginiamycin af kendt styrke.

⁽¹⁾ 1 mg virginiamycinbase svarer til 1 000 »UK« enheder.

(a) Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver tilsvarende bakteriesuspensioner.

(b) Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen, og som giver de samme resultater, kan anvendes.

5. Standardopløsninger

En nøjagtigt afvejet mængde standardpræparat (4.7) opløses i methanol (4.4) og fortyndes med methanol (4.4), således at der fremkommer en stamopløsning indeholdende 1 000 µg virginiamycin pr. ml. Opbevaret i tilproppede flasker ved 4° C vil denne opløsning være holdbar i indtil 5 dage.

Af denne stamopløsning fremstilles ved successiv fortynding med blandingen (4.5) følgende opløsninger :

S ₈	1	µg/ml,
S ₄	0,5	µg/ml,
S ₂	0,25	µg/ml,
S ₁	0,125	µg/ml.

6. Fremstilling af ekstrakt og testopløsninger

6.1. Ekstraktion

6.1.1. Produkter med et virginiamycinindhold på til og med 100 mg/kg

50,0 g af prøven afvejes. Der tilsættes 200 ml af opløsningen (4.6) og rystes i 30 minutter. Efter bundfældning eller centrifugering udtages 20 ml af supernatanten, som inddampes til ca. 5 ml i en rotationsfordamper ved højst 40° C. Remanensen fortyndes med blandingen (4.5) indtil et forventet virginiamycinindhold på 1 µg/ml (= U₈).

6.1.2. Produkter med et virginiamycinindhold på over 100 mg/kg

Der afvejes en mængde af prøven på højst 10,0 g, der indeholder mellem 1 og 50 mg virginiamycin. Der tilsættes 100 ml af opløsningen (4.6) og rystes i 30 minutter. Efter bundfældning eller centrifugering fortyndes supernatanten med blandingen (4.5) indtil et forventet virginiamycinindhold på 1 µg/ml (= U₈).

6.2. Testopløsninger

Opløsningerne U₄ (forventet indhold : 0,5 µg/ml), U₂ (forventet indhold : 0,25 µg/ml) og U₁ (forventet indhold : 0,125 µg/ml) fremstilles af opløsning U₈ ved successiv fortynding (1 : 1) med blandingen (4.5).

7. Testmetode

7.1. Podning af testsubstratet

Testsubstratet (4.1) podes med bakteriesuspensionen (3.2) ved ca. 50° C. På plader med testsubstrat (4.1) bestemmes forud den mængden bakteriesuspension, der giver de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af virginiamycin.

7.2. Forberedelse af pladerne

Diffusionen i agar udføres på plader med de fire koncentrationer af standardopløsningen (S₈, S₄, S₂, S₁) og de fire koncentrationer af testopløsningen (U₈, U₄, U₂ og U₁). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst otte huller i agarsubstratet med en diameter på 10 til 13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring ovenpå, 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.1), der er podet som angivet i 7.1, så der opnås et ca. 2 mm tykt lag (60 ml til en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes vandret til størkning, hullerne udstanses, og nøjagtigt afmålte mængder af test- og standardopløsning anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren). Hver koncentration skal anbringes mindst fire gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

7.3. Inkubation

Pladerne inkuberes i 16 til 18 timer ved 30° C ± 2° C.

8. Bedømmelse

Hæmningszonernes diameter måles med 0,1 mm nøjagtighed. Middeldiameteren for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationen i forhold til hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den bedst tilpassede rette linje for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet, f.eks. som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen :

$$(a) \text{ SL} = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Det »bedst tilpassede punkt« for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen :

$$(b) \text{ SH} = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

På tilsvarende måde beregnes det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet (UH) ved at erstatte s_1 , s_2 , s_4 og s_8 med u_1 , u_2 , u_4 og u_8 i ovennævnte formler.

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer til stede, som forstyrrer analysen, vil linjerne være parallelle. Til praktiske formål kan linjerne betragtes som værende parallelle, hvis værdierne (SH-SL) og (UH-UL) ikke afgiver mere end 10 % fra middelværdien.

Såfremt linjerne viser sig ikke at være parallelle, kan enten u_1 og s_1 eller u_8 og s_8 udelades, og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af de alternative formler, for at opnå de alternative »bedst tilpassede linjer« :

$$(a') \text{ SL} = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{eller} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{eller} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

og tilsvarende for UL og UH. De samme kriterier for parallelisme skal være opfyldt. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

Hvis linjerne kan betragtes som værende parallelle, beregnes logaritmen til den relative styrke ($\log A$) ved hjælp af én af følgende formler alt efter om der er anvendt 3 eller 4 koncentrationer til at bestemme parallelismen.

For fire koncentrationer

$$(c) \text{ Log } A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

For tre koncentrationer

$$(d) \text{ Log } A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

eller

$$(d') \text{ Log } A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Prøveekstraktets styrke = den pågældende standards styrke A :

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Hvis den relative styrke ligger uden for området 0,5 til 2,0, gentages analysen med den fornødne tilpasning af virginiamycinkoncentrationen i ekstrakterne eller, hvis dette ikke er muligt, i standardopløsningerne. Hvis den relative styrke ikke kan bringes inden for det krævede interval, må de resultater, der opnås, betragtes som tilnærmede og dette bør anføres i den endelige rapport.

Hvis linjerne ikke kan betragtes som værende parallelle, gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallelisme, må bestemmelsen betragtes som utilfredsstillende.

Resultatet udtrykkes i milligram virginiamycin pr. kilogram foderstof.

9. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, udført på samme prøve af samme person, bør ikke overstige :

- 2 mg/kg i absolut værdi for et indhold af virginiamycin på til og med 10 mg/kg ;
 - 20 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 10 og til og med 25 mg/kg ;
 - 5 mg/kg i absolut værdi for et indhold på over 25 til og med 50 mg/kg ;
 - 10 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 50 mg/kg.
-

BILAG III

1. BESTEMMELSE AF ZINKBACITRACIN

— ved diffusion på agarplader —

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden anvendes til bestemmelse af zinkbacitracin i foderstoffer og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelsen er 5 mg/kg (5 ppm)⁽¹⁾.

2. Princip

Prøven ekstraheres ved pH 2 med en blanding af methanol, vand, saltsyre og natriumsulfidopløsning. Natriumsulfidet tilsættes for at udfælde opløselige kobbersalte, der kan påvirke bestemmelsen. Ekstrårets pH indstilles til 6,5, og der inddampes (om nødvendigt) og fortyndes. Ekstrårets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af zinkbacitracin i et agarsubstrat podet med *Micrococcus luteus (flavus)*. Diffusionen viser sig ved dannelse af zoner, hvori mikroorganismens vækst er hæmmet. Diameteren af disse zoner anses for at være direkte proportional med logaritmen til den antibiotiske styrke inden for de anvendte koncentrationer af antibiotikum.

3. Testorganisme : *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240

3.1. Opbevaring af stamkulturen

Micrococcus luteus (flavus) podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes i 24 timer ved 30° C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4° C. Den ompodes hver anden uge.

3.2. Fremstilling af bakteriesuspension (a)

Væksten fra et skråagarglas (3.1) opslæmmes med 2 til 3 ml natriumchloridopløsning (4.3). Denne opslæmning anvendes til podning af 250 ml næringssubstrat (4.1) i en Roux-kolbe, og der inkuberes i 18 til 20 timer ved 30° C. Væksten opslæmmes i 25 ml natriumchloridopløsning (4.3) og fortyndes 10 gange med samme opløsning. Opslæmningens lystransmission skal være ca. 75 % målt ved 650 nm mod natriumchloridopløsning (4.3) i en 1 cm celle. Opslæmningen kan opbevares ved ca. 4° C i en uge.

4. Næringssubstrater og reagenser

4.1. Næringssubstrat (b)

Kødpepton	6,0 g,
Trypton	4,0 g,
Gærekstrakt	3,0 g,
Kødekstrakt	1,5 g,
Glucose	1,0 g,
Agar	10,0 til 20,0 g,
Vand	1 000 ml,
pH 6,5 til 6,6 (efter sterilisering).	

4.2. Testsubstrat (b)

Trypton	10,0 g,
Gærekstrakt	3,0 g,
Kødekstrakt	1,5 g,
Glucose	1,0 g,
Agar	10,0 til 20,0 g,
Tween 80	1 ml,
Vand	1 000 ml,
pH 6,5 (efter sterilisering).	

4.3. Natriumchloridopløsning, 0,8 % (w/v) : 8 g natriumchlorid opløses i vand, fortyndes til 1 000 ml og steriliseres.

4.4. Blanding af methanol, vand og saltsyre (4.6) : 80 : 17,5 : 2,5 (v/v/v).

⁽¹⁾ 1 mg zinkbacitracin af foderstofkvalitet svarer til 42 internationale enheder (IE).

(a) Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver tilsvarende bakteriesuspensioner.

(b) Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen, og som giver de samme resultater, kan anvendes.

4.5. *Phosphatbuffer, pH 6,5*

Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	22,15 g,
Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4	27,85 g,
Vand til	1 000 ml.

4.6. Saltsyre, ρ : 1,18 → 1,19

4.7. Saltsyre, 0,1 M.

4.8. Natriumhydroxid, 1 M.

4.9. Natriumsulfidopløsning, ca. 0,5 M.

4.10. Bromkresolpurpur, 0,04 % (w/v) opløsning: 0,1 g bromkresolpurpur opløses i 18,5 ml 0,01 M natriumhydroxid. Der fyldes op til 250 ml med vand og blandes.

4.11 Standardpræparat: zinkbacitracin af kendt styrke (i IE).

5. **Standardopløsninger**

Der afvejes en mængde zinkbacitracin (4.11) svarende til 1 050 IE (ifølge den opgivne styrke). Der tilsættes 5 ml 0,1 M saltsyre (4.7), og efter 15 minutters henstand tilsættes 30 ml vand. pH indstilles til 4,5 med phosphatbufferen (4.5) (ca. 4 ml), hvorefter der fyldes op til 50 ml med vand og blandes omhyggeligt (1 ml = 21 IE).

Af denne stamopløsning fremstilles ved successiv fortynding med phosphatbufferen (4.5) følgende opløsninger:

S_8	0,42	IE/ml,
S_4	0,21	IE/ml,
S_2	0,105	IE/ml,
S_1	0,0525	IE/ml.

6. **Fremstilling af ekstrakt og testopløsninger**6.1. *Ekstraktion*

6.1.1. Forblandinger og mineralske foderstoffer

2,0 til 5,0 g af prøven afvejes, og efter tilsætning af 29,0 ml af blandingen (4.4) og 1,0 ml natriumsulfidopløsning (4.9) rystes kortvarigt. Det kontrolleres, at pH er ca. 2. Der rystes i 10 min., tilsættes 30 ml phosphatbuffer (4.5), rystes i 15 minutter og centrifugeres. Der udtages en passende mængde af supernatanten, og pH indstilles til 6,5 med 1 M natriumhydroxid (4.8) enten ved hjælp af et pH-meter eller med bromkresolpurpuropløsningen (4.10) som indikator.

Der fortyndes med phosphatbuffer (4.5) indtil et forventet zinkbacitracinindhold på 0,42 IE/ml (= U_8).

6.1.2. Proteinkoncentrater

10,0 g af prøven afvejes, og efter tilsætning af 49,0 ml af blandingen (4.4) og 1,0 ml natriumsulfidopløsning (4.9) rystes kortvarigt. Det kontrolleres, at pH er ca. 2. Der rystes i 10 minutter, tilsættes 50 ml phosphatbuffer (4.5), rystes i 15 minutter og centrifugeres. Der udtages en passende mængde af supernatanten, og pH indstilles til 6,5 med 1 M natriumhydroxidopløsning (4.8) enten ved hjælp af et pH-meter eller med bromkresolpurpuropløsningen (4.10) som indikator. Der inddampes til ca. halvt volumen på rotationsfordamper ved højst 35° C.

Der fortyndes med phosphatbuffer (4.5) indtil et forventet zinkbacitracinindhold på 0,42 IE/ml (= U_8).

6.1.3. Andre foderstoffer

10,0 g af prøven afvejes (20,0 g ved et forventet zinkbacitracinindhold på 5 mg/kg). Der tilsættes 24 ml af blandingen (4.4) og 1,0 ml natriumsulfidopløsning (4.9), hvorefter der homogeniseres i 10 minutter. Der tilsættes 25 ml phosphatbuffer (4.5), rystes i 15 minutter og centrifugeres. Der udtages 20 ml af supernatanten, og pH indstilles til 6,5 med 1 M natriumhydroxid (4.8) enten ved hjælp af et pH-meter eller med bromkresolpurpuropløsningen (4.10) som indikator. Der inddampes til ca. 4 ml på rotationsfordamper ved højst 35° C. Remanensen fortyndes med phosphatbuffer (4.5) indtil et forventet zinkbacitracinindhold på 0,42 IE/ml (= U_8).

6.2. *Testopløsninger*

Opløsningerne U_4 (forventet indhold: 0,21 IE/ml), U_2 (forventet indhold 0,105 IE/ml) og U_1 (forventet indhold: 0,0525 IE/ml) fremstilles af opløsning U_8 ved successiv fortynding (1 : 1) med phosphatbuffer (4.5).

7. Testmetode

7.1. Podning af testsubstratet

Testsubstratet (4.2) podes med bakteriesuspensionen (3.2) ved ca. 50° C. På plader med testsubstrat (4.2) bestemmes forud den mængde bakteriesuspension, der giver de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af zinkbacitracin.

7.2. Forberedelse af pladerne

Diffusionen i agar udføres på plader med de fire koncentrationer af standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og de fire koncentrationer af testopløsningen (U_8, U_4, U_2 og U_1). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst otte huller i agarsubstratet med en diameter på 10 til 13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring ovenpå, 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.1), der er podet som angivet i 7.1, så der opnås et ca. 2 mm tykt lag (60 ml til en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes vandret til størkning, hullerne udstanses, og nøjagtigt afmålte mængder af test- og standardopløsning anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren). Hver koncentration skal anbringes mindst fire gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

7.3. Inkubation

Pladerne inkuberes i 16 til 18 timer ved 30° C ± 2° C.

8. Bedømmelse

Hæmningszonernes diameter måles med 0,1 mm nøjagtighed. Middeldiameteren for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationen i forhold til hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den »bedst tilpassede« rette linje for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet, f.eks. som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen :

$$(a) \text{ SL} = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Det »bedst tilpassede punkt« for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen :

$$(b) \text{ SH} = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

På tilsvarende måde beregnes det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet (UH) ved at erstatte s_1, s_2, s_4 og s_8 med u_1, u_2, u_4 og u_8 i ovennævnte formler.

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer til stede, som forstyrrer analysen, vil linjerne være parallelle. Til praktiske formål kan linjerne betragtes som værende parallelle, hvis værdierne (SH-SL) og (UH-UL) ikke afgiver mere end 10 % fra middelværdien.

Såfremt linjerne viser sig ikke at være parallelle, kan enten u_1 og s_1 eller u_8 og s_8 udelades, og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af de alternative formler, for at opnå de alternative »bedst tilpassede linjer« :

$$(a') \text{ SL} = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{eller} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{eller} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

og tilsvarende for UL og UH. De samme kriterier for parallelisme skal være opfyldt. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

Hvis linjerne kan betragtes som værende parallelle, beregnes logaritmen til den relative styrke (log A) ved hjælp af én af følgende formler alt efter om der er anvendt 3 eller 4 koncentrationer til at bestemme parallelismen.

For fire koncentrationer

$$(c) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

For tre koncentrationer

$$(d) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

eller

$$(d') \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Prøveekstraktets styrke = den pågældende standards styrke \times A :

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Hvis den relative styrke ligger uden for området 0,5 til 2,0, gentages analysen med den fornødne tilpasning af zinkbacitracin i ekstrakterne eller, hvis dette ikke er muligt, i standardopløsningerne. Hvis den relative styrke ikke kan bringes inden for det krævede interval, må de resultater, der opnås, betragtes som tilnærmede og dette bør anføres i den endelige rapport.

Hvis linjerne ikke kan betragtes som værende parallelle, gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallelisme, må bestemmelsen betragtes som utilfredsstillende.

Resultatet udtrykkes i milligram zinkbacitracin pr. kilogram foderstof.

9. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, udført på samme prøve af samme person, bør ikke overstige :

- 2 mg/kg i absolut værdi for et indhold af zinkbacitracin på til og med 10 mg/kg ;
- 20 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 10 og til og med 25 mg/kg ;
- 5 mg/kg i absolut værdi for et indhold på over 25 til og med 50 mg/kg ;
- 10 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 50 mg/kg.*