

384L0004

N:o L 15/28

EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI

18.1.84

KOMISSION DIREKTIIVI,

annettu 20 päivänä joulukuuta 1983,

yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten annettujen direktiivien
71/393/ETY, 72/199/ETY ja 78/633/ETY muuttamisesta
(84/4/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamis-
sopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määrittämis-
menetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päi-
vänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin
70/373/ETY⁽¹⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettu-
na Kreikan liittymisasiakirjalla, ja erityisesti sen 2 artik-
lan,

sekä katsoo, että

komission direktiiveillä 71/393/ETY⁽²⁾, 72/199/ETY⁽³⁾
ja 78/633/ETY⁽⁴⁾ säädetään raakarasvojen ja -öljyjen,
virginiamysiinin ja sinkkibasitrasiiinin määrittämis-
menetelmistä; näiden menetelmien korvaaminen tieteellisen ja
teknisen tietämyksen edistymistä vastaavilla menetelmil-
lä näyttää tarpeelliselta, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän
rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Korvataan direktiivin 71/393/ETY liitteessä oleva 4 osa
"Raakarasvan ja -öljyn määrittäminen" tämän direktiivin
liitteellä I.

2 artikla

Korvataan direktiivin 72/199/ETY liitteessä II oleva
5 osa "Virginiamysiinin määrittäminen diffuusiolla agar-
alustassa" tämän direktiivin liitteellä II.

3 artikla

Korvataan direktiivin 78/633/ETY liitteessä oleva
1 osa "Sinkkibasitrasiiinin määrittäminen diffuusiolla agar-
alustassa" tämän direktiivin liitteellä III.

4 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudat-
tamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset
määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä kesäkuuta
1984. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipy-
mättä.

5 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 20 päivänä joulukuuta 1983.

Komission puolesta

Poul DALSGER

Komission jäsen

(1) EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2

(2) EYVL N:o L 279, 20.12.1971, s. 7

(3) EYVL N:o L 123, 29.5.1972, s. 6

(4) EYVL N:o L 206, 29.7.1978, s. 43

LIITE I

”4. RAAKARASVAN JA -ÖLJYN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää rehuissa oleva raakasvan ja -öljyn määrä. Siihen eivät kuulu öljykasvien siemenistä ja öljypitoisista hedelmistä annetut määritykset, jotka on esitetty 22 päivänä syyskuuta 1966 annetussa neuvoston asetuksessa N:o 136/66/ETY.

Rehun laadusta riippuen on käytettävä jompaakumpaa alla kuvatuista menetelmistä.

1.1 A-menetelmä

Menetelmä soveltuu kasvipärisiin rehuihin, lukuun ottamatta sellaisia rehuja, joiden tiedetään sisältävän öljyjä ja rasvoja, joita ei ilman edeltävää hydrolyysiä voida kokonaan uuttaa petrolietterillä. Niihin kuuluvat gluteenit, hiivat, soija- ja perunaproteiinit. Menetelmä soveltuu myös rehuseoksiin, paitsi niihin, jotka sisältävät maitojauhetta tai joiden öljyjä ja rasvoja ei voida täysin uuttaa petrolietterillä ilman edeltävää hydrolyysiä.

1.2 B-menetelmä

Menetelmä soveltuu eläinperäisiin rehuihin sekä A-menetelmän poikkeuksena mainittuihin rehuihin.

2. Periaate

2.1 A-menetelmä

Näyte uutetaan petrolietterillä. Liuos tislataan pois, ja jäännös kuivataan ja punnitaan.

2.2 B-menetelmä

Näyte käsitellään keittämällä sitä suolahapon kanssa. Seos jäädytetään ja suodatetaan. Jäännös pestään ja kuivataan, ja määritystä jatketaan A-menetelmän mukaan.

3. Reagenssit

3.1 Petrolietteri, kiehumisväli: 40–60 °C. Bromiluvun on oltava alle 1 ja haihdutusjäännöksen alle 2 mg/100 ml.

3.2 Vedetön natriumsulfaatti.

3.3 3 N suolahappo.

3.4 Suodatuksen apuaine, esim. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. Välineistö

4.1 Uuttolaitteisto. Jos käytetään Soxhlet-laitteistoa, refluksointinopeuden on oltava sellainen, että Soxhletvälisän täytyminen liuottimella ja tyhjeneminen siitä tapahtuvat noin 10 kertaa tunnissa. Jos laitteistoon kuuluu suoramallinen välisosa, refluksointinopeuden on oltava noin 10 ml minuutissa.

4.2 Uuttohylsyjä, joissa ei ole petrolietteriin liukenevaa materiaalia ja joiden huokoisuus täyttää 4.1 kohdassa esitetyt vaatimukset.

4.3 Kuivauskaappi, joko vakuumikaappi, joka on asetettu 75 °C ± 3 °C:een, tai kaappi ilmankiertomahdollisuuksineen, joka on asetettu 100 ± 3 °C:een.

5. Menettely

5.1 A-menetelmä (katso 8.1 kohta)

Punnitaan 5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella uuttohylsyyn (4.2) ja peitetään rasvattomalla vanulla tai puuvillalla.

Hylsy asetetaan uuttolaitteeseen (4.1) ja sitä uutetaan kuusi tuntia petrolietterillä (3.1). Uute otetaan talteen kuivaan, punnittuun pulloon, joka sisältää hohkakivijyväsä(1).

Liuotin tislataan pois. Haihdutusjäännös kuivataan pitämällä pulloa puolitoista tuntia kuivauskaapissa (4.3). Sen annetaan jäähtyä eksikaattorissa ja se punnitaan. Kuivausta jatketaan edelleen 30 minuutin ajan sen varmistamiseksi, että öljyn ja rasvan paino pysyy vakiona (kahden peräkkäisen punnituksen välisen painoeron on oltava alle 1 mg).

(1) Kun rasvoille tai öljyille tehdään vielä tämän jälkeen laatuasteja, hohkakivijyväsät korvataan lasihelmillä.

5.2 *B-menetelmä*

Punnitaan 2,5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella (katso 8.2 kohta) 400 ml:n dekanterilasiin tai 300 ml:n erlenmeyerpulloon ja lisätään 100 ml 3 N (33) suolahappoa ja hohkakiviä. Dekanterilasi peitetään kellolasilla tai erlenmeyerpullo yhdistetään pystyjäähdyttäjään. Seoksen lämpötila nostetaan varovasti kiehumispisteeseen käyttäen pientä liekkiä tai lämpölevyä ja seoksen annetaan kiehua hiljalleen tunnin ajan. Näytteen tarttumista astian seinämiin tulee välttää.

Astian sisällön annetaan jäähtyä ja lisätään suodatuksen apuainetta (3.4) sen verran, ettei rasvaa ja öljyä häviä suodatuksessa. Suodatukseen käytetään kostutettua, rasvatonta kaksinkertaista suodatinpaperia. Jäännös pestään kylmällä vedellä kunnes saadaan neutraali suodos. Tarkastetaan, ettei suodos sisällä öljyä tai rasvaa. Jos niitä esiintyy, on näyte uutettava ennen hydrolyysia petrolietterillä A-menetelmän mukaisesti.

Jäännöksen sisältävä kaksinkertainen suodatinpaperi asetetaan kellonlasille ja sen annetaan kuivua puolitoista tuntia lämpökaapissa $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$:ssa.

Kuivan jäännöksen sisältävä kaksinkertainen suodatinpaperi pannaan uuttohylsyyn (4.2) ja peitetään rasvattomalla vanulla tai puuvillalla. Hylsy pannaan uuttolaitteeseen (4.1) ja suoritusta jatketaan 5.1 kohdan toisessa ja kolmannessa alakohdassa esitetyllä tavalla.

6. **Tuloksen laskeminen**

Jäännöksen paino ilmoitetaan prosenttina näytteen painosta.

7. **Toistettavuus**

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

0,2 %, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, korkeintaan 5 % olevien raakarasva- ja -öljypitoisuuksien osalta,

4,0 %, suurimpaan arvoon verrattuna, välillä 5–10 % olevien pitoisuuksien osalta,

0,4 %, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, yli 10 % olevien pitoisuuksien osalta.

8. **Huomautuksia**

8.1 Runsaasti rasvaa sisältävät näytteet, vaikeasti hienonnettava näytteet tai näytteet, joista on vaikea saada homogeenista näytettä olisi käsiteltävä seuraavasti:

Punnitaan 20 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella ja siihen sekoitetaan vähintään 10 g vedetöntä natriumsulfaattia (3.2). Uutetaan petrolietterillä (3.1) 5.1 kohdassa esitetyllä tavalla. Uutoksen tilavuus säädetään 500 ml:ksi petrolietterillä (3.1) ja homogenoidaan. Siirretään 50 ml liuosta pieneen, kuivaan ja punnittuun pulloon, joka sisältää hohkakiviä⁽¹⁾. Liuotin erotetaan tislamalla, jäännös kuivataan ja suoritusta jatketaan 5.1 kohdan viimeisessä alakohdassa kuvatulla tavalla.

Liuotin erotetaan hylsyssä olevasta uuttojäännöksestä, jäännös jauhetaan 1 mm:n hienoiseksi, pannaan takaisin hylsyyn (lisäämättä natriumsulfaattia) ja suoritusta jatketaan 5.1 kohdan toisessa ja kolmannessa alakohdassa kuvatulla tavalla.

Rasvan ja öljyn pitoisuus prosentteina näytteestä lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

a = ensimmäisen uuton jälkeen saadun jäännöksen (osa liuosmäärästä) paino grammoina,

b = toisen uuton jälkeen saadun jäännöksen paino grammoina

8.2 Pieniä rasva- ja öljymääriä sisältävien näytteiden punnitusmäärä voidaan nostaa 5 g:aan.”

⁽¹⁾ Kun rasvoille tai öljyille tehdään vielä tämän jälkeen laatutestejä, hohkakiviä korvataan lasihelmillä.

LIITE II

”5. VIRGINIAMYSIININ MÄÄRITYS

– diffuusiolla agar-alustassa –

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää virginiamysiini rehuista ja esiseoksista. Määrityksen alaraja on 2 mg/kg (2 miljoonasosaa)⁽¹⁾.

2. Periaate

Näyte uutetaan Tween-80:n metanolipitoisella liuoksella. Uute dekantoidaan tai sentrifugoidaan ja laimennetaan. Sen antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla virginiamysiinin diffuusio agar-alustalla, johon on ympätty *Micrococcus luteus*. Diffuusio mitataan inhibitiivyöhykkeinä, joita mikro-organismi muodostaa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on käytetyissä antibioottikon-sentraatioissa suoraan verrannollinen antibioottikon-sentraation logaritmiin.

3. Mikro-organismi: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1 Kantaviljelmän kasvatusta

Micrococcus luteus ympätään putkiin, jotka sisältävät kasvatusalustasta (4.1) valmistettuja agar-vinopintoja. Inkuboidaan 24 tuntia 30 °C:ssa, säilytetään jääkaapissa noin 4 °C:ssa, ja siirrostetaan uudelleen joka toinen viikko.

3.2 Bakterisuspension valmistus^(a)

Äskettäin valmistetusta agar-vinopinnasta (3.1) kasvusto huuhdellaan 2–3 ml:lla natriumkloridiliuosta (4.3). Suspensio siirrostetaan Roux-pulloon, joka sisältää 250 ml kasvatusliuosta (4.1) ja inkuboidaan 18–20 tuntia 30 °C:ssa. Kasvusto otetaan talteen 25 ml:aan natriumkloridiliuosta (4.3) ja homogenoidaan.

Suspensio laimennetaan suhteessa 1/10 natriumkloridiliuokseen (4.3). Suspension valon transmission on oltava noin 75 % mitattuna 650 nm:ssa 1 cm:n kyvetissä natriumkloridiliuosta (4.3) vastaan. Suspensiota voidaan säilyttää yhden viikon ajan noin 4 °C:ssa.

4. Kasvatusalustat ja reagenssit

4.1 Kasvatus- ja määritysalusta^(b)

Lihapeptoni	6,0 g
Tryptoni	4,0 g
Hiiivauute	3,0 g
Lihauute	1,5 g
Glukoosi	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vesi	1 000 ml
pH 6,5 (steriloinnin jälkeen)	

4.2 Fosfaattipuskuriliuos, pH 6

Kaliumvetyfosfaatti, K ₂ HPO ₄	2,0 g
Kaliumdivetyfosfaatti, KH ₂ PO ₄	8,0 g
Vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.3 0,8 % (w/v) natriumkloridiliuos: liuotetaan 8 g natriumkloridia veteen ja laimennetaan 1 000 ml:ksi ja steriloidaan.

4.4 Metanoli.

4.5 Fosfaattipuskuriliuos (4.2)/metanoli (4.4) -seos 80/20 (v/v).

4.6 0,5 % (w/v) metanolipitoinen Tween 80 -liuos: liuotetaan 5 g Tween 80:aa metanoliin (4.4) ja laimennetaan metanolilla 1 000 ml:ksi.

4.7 Standardiyhdiste: tunnetun aktiivisuuden omaava virginiamysiini.

⁽¹⁾ 1 mg virginiamysiiniä vastaa 1 000 UK-yksikköä.

^(a) Voidaan käyttää muita menetelmiä edellyttäen, että niillä on osoitettu saatavan aikaan samanlaisia bakterisuspensioita.

^(b) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

5. Standardiliuokset

Liuotetaan tarkkaan punnittu määrä standardiyhdistettä (4.7) metanoliin (4.4) ja tämä laimennetaan metanolilla (4.4) kantaliuokseksi, joka sisältää 1 000 µg virginiamysiiniä/ml. Liuos säilyy 4 °C:ssa tulpalla suljetussa pullossa korkeintaan viisi päivää.

Kantaliuoksesta valmistetaan peräkkäin laimentaen seosta (4.5) käyttäen seuraavat liuokset:

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

6. Uutteen ja määritysliuosten valmistus

6.1 *Uutto*

6.1.1 Virginiamysiiniä enintään 100 mg/kg sisältävät tuotteet

Punnitaan 50 g näytettä. Lisätään 200 ml liuosta (4.6), ravistellaan 30 minuutin ajan, annetaan laskeutua tai sentrifugoidaan. Supernatantista otetaan 20 ml:n erä ja haihdutetaan noin 5 ml:ksi pyöröhaihduttimessa korkeintaan 40 °C:n lämpötilassa. Jäännös laimennetaan seoksella (4.5) siten, että odotetuksi virginiamysiinipitoisuudeksi saadaan 1 µg/ml (= u₈).

6.1.2 Virginiamysiiniä yli 100 mg/kg sisältävät tuotteet

Punnitaan näytemäärä, joka ei ylitä 10,0 g ja joka sisältää virginiamysiiniä 1–50 mg. Lisätään 100 ml liuosta (4.6), ravistellaan 30 minuutin ajan, annetaan laskeutua tai sentrifugoidaan. Supernatantti laimennetaan seoksella (4.5) siten, että virginiamysiinipitoisuudeksi saadaan 1 µg/ml (= u₈).

6.2 *Määritysliuokset*

U₈-liuoksesta valmistetaan liuokset u₄ (oletettu pitoisuus: 0,5 µg/ml), u₂ (oletettu pitoisuus: 0,25 µg/ml) ja u₁ (oletettu pitoisuus: 0,125 µg/ml) seoksella (4.5) peräkkäin laimentaen (1 + 1).

7. Määrittämismenetelmä

7.1 *Siirrostus määritysalustaan*

Bakteerisuspensio (3.2) siirrostetaan noin 50 °C:ssa määritysalustaan (4.1). Alustasta (4.1) valmistetuilla maljoilla tehdään esikokeet, joilla määritetään eri virginiamysiinikonsentraatioilla suurimmat ja kirkkaimmat inhibiiviyöhykkeet antava bakteerisuspensiomäärä.

7.2 *Maljojen valmistus*

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen neljää standardiliuoskonsentraatiota (S₈, S₄, S₂ ja S₁) ja neljää määritysliuoskonsentraatiota (U₈, U₄, U₂ ja U₁). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä neljä uute- ja standardikonsentraatiota. Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agar-alustaan voidaan tehdä ainakin 8 reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm ja joiden keskustat ovat vähintään 30 mm:n päässä toisistaan. Voidaan käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Maljoille kaadetaan sellainen määrä 7.1 kohdan mukaisesti siirrostettua alustaa (4.1), joka muodostaa noin 2,0 mm paksun kerroksen (kun malja on vetoisuudeltaan 60 ml ja läpimitaltaan 200 mm). Jäähdytetään vaakasuoralla alustalla, tehdään reiät ja niihin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet määritys- ja standardiliuoksia (läpimitasta riippuen 0,10–0,15 ml/reikä). Kutakin pitoisuutta käytetään ainakin neljä kertaa siten, että kussakin määrityksessä suoritetaan arviointi 32 inhibiiviyöhykkeestä.

7.3 *Inkubointi*

Maljoja inkuboidaan 16–18 tuntia 30 ± 2 °C:ssa.

8. Laskeminen

Inhibiiviyöhykkeiden läpimitta mitataan 0,1 mm:n tarkkuudella. Kutakin pitoisuutta vastaavien mittausten keskiarvoista piirretään puolilogaritmi-paperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritmia inhibiiviyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Piirretään sekä standardiliuoksen että uutteen osalta parhaita sovitusta edustavat suorat esimerkiksi seuraavasti:

Parhaita sovitusta edustava piste pienimmän standardipitoisuuden (SL) osalta määritetään käyttäen kaavaa:

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

Parhaita sovitusta edustava piste suurimman standardipitoisuuden (SH) osalta määritetään käyttäen kaavaa:

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

Parhaan sovituksen omaavat pisteet lasketaan samoin uutteen pienimmän pitoisuuden (UL) ja uutteen korkeimman pitoisuuden (UH) osalta korvaamalla edellä olevissa kaavoissa S_1, S_2, S_4 ja S_8 U_1 :lla, U_2 :lla, U_4 :lla ja U_8 :lla.

Lasketut SL- ja SH-arvot merkitään samalle kuvaajapaperille ja ne yhdistetään parhaimman sovituksen omaavan suoran muodostamiseksi standardiluoksen osalta. Samoin merkitään UL- ja UH-arvot ja ne yhdistetään parhaimman sovituksen omaavan suoran muodostamiseksi uutteen osalta.

Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, pitäisi suorien olla yhdensuuntaiset. Käytännössä suorien voidaan katsoa olevan yhdensuuntaisia, jos arvot (SH-SL) ja (UH-UL) eivät poikkea keskiarvostaan yli 10%.

Jos suorat eivät ole yhdensuuntaiset, joko u_1 ja s_1 tai u_8 ja s_8 voidaan hylätä ja SL, SH, UL ja UH laskea käyttäen vaihtoehtoisia kaavoja vaihtoehtoisten parhaimman sovituksen omaavien suorien muodostamiseksi:

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

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

ja käyttäen samoja kaavoja UL:n ja UH:n tapauksissa. Yhdensuuntaisuuden on oltava samojen periaatteiden mukainen.

Tulosten laskeminen kolmen pitoisuuden perusteella on mainittava määrittyselosteessa.

Kun suoria pidetään yhdensuuntaisina, suhteellisen aktiivisuuden logaritmi ($\log A$) lasketaan jollakin seuraavista kaavoista sen mukaan, määritetäänkö yhdensuuntaisuus kolmella vai neljällä pitoisuudella:

Neljän pitoisuuden osalta

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

Kolmen pitoisuuden osalta

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

tai

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

Näytteestä saadun uutteen aktiivisuus = vastaavan standardin aktiivisuus $\times A$.

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

Jos suhteellisen aktiivisuuden havaitaan olevan alueen 0,5–2,0 ulkopuolella, määrittys suoritetaan uudelleen siten, että uutteen konsentraatiot säädetään sopiviksi tai, jos tämä ei ole mahdollista, standardiluosten konsentraatiot säädetään sopiviksi. Kun suhteellista aktiivisuutta ei saada tuotua vaaditulle alueelle, on mikä tahansa saatu tulos katsottava likimääräiseksi ja tämä on mainittava määrittyselosteessa.

Kun suoria ei katsota yhdensuuntaisiksi, määrittys toistetaan. Jos yhdensuuntaisuutta ei vieläkään saada aikaan, määrittystä ei voi pitää hyväksyttävänä.

Tulokset ilmoitetaan milligrammoina virginiamysiiniä rehukiloa kohden.

9. Toistettavuus

Samasta näytteestä saman henkilön suorittaman kahden määrittelyn tulosten välinen ero ei saa ylittää:

2 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, korkeintaan 10 mg/kg olevien virginiamysiinipitoisuuksien osalta;

20%, suurimpaan arvoon verrattuna, välillä 10–25 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta;

5 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, välillä 25–50 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta;

10%, suurimpaan arvoon verrattuna, yli 50 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta.”

LIITE III

"1. SINKKIBASITRASIININ MÄÄRITYS

– diffuusiolla agar-alustassa –

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää rehujen ja esiseosten sinkkibasitrasiiinipitoisuus. Määrittäksen alaraja on 5 mg/kg (5 miljoonasosaa)⁽¹⁾.

2. Periaate

Näyte uutetaan metanoli/vesi/kloorivetyhappo-seoksella, jonka pH on 2. Natriumsulfidilisäyksen avulla voidaan saostaa liukoiset kuparisuolat, jotka saattaisivat häiritä määrittystä. Uutteen pH säädetään arvoon 6,5, väkevöidään (tarvittaessa) ja laimennetaan. Sen antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla sinkkibasitrasiiinin diffuusio agar-alustassa, johon on ympätty *Micrococcus luteus* (*flavus*). Diffuusio mitataan inhibiiovyöhykkeinä, jotka mikro-organismi muodostaa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on käytetyissä antibioottikonsentraatioissa suoraan verrannollinen antibioottikonsentraation logaritmiin.

3. Mikro-organismi: "Micrococcus luteus (flavus)" ATCC 10240

3.1 Kantaviljelmän kasvatust

Micrococcus luteus (*flavus*) ympätään putkiin, jotka sisältävät kasvatusalustasta (4.1) valmistettuja agarvinopintoja. Inkuboidaan 24 tuntia 30 °C:ssa, säilytetään jääkaapissa noin 4 °C:ssa ja siirrostetaan uudestaan joka toinen viikko.

3.2 Bakterisuspension valmistus^(a)

Äskettäin valmistetusta agar-vinopinnasta (3.1) kasvusto huuhdellaan 2–3 ml:lla natriumkloridiliuosta (4.3). Suspensio siirrostetaan 250 ml:aan kasvatusliuosta (4.1), joka on steriilissä Roux-pullossa ja inkuboidaan 18–20 tuntia 30 °C:ssa. Kasvusto otetaan talteen 25 ml:aan natriumkloridiliuosta (4.3) ja homogenoidaan.

Suspensio laimennetaan suhteessa 1/10 natriumkloridiliuokseen (4.3). Suspension valon transmision on oltava noin 75 % mitattuna 650 nm:ssa 1 cm:n kyvetissä natriumkloridiliuosta (4.3) vastaan. Suspensiota voidaan säilyttää yhden viikon ajan noin 4 °C:ssa.

4. Kasvatusalustat ja reagenssit

4.1 Kasvatusalusta^(b)

Lihapeptoni	6,0 g
Tryptoni	4,0 g
Hiiuvauute	3,0 g
Lihauute	1,5 g
Glukoosi	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vesi	1 000 ml

pH 6,5–6,6 (steriloinnin jälkeen).

4.2 Määritysalusta^(b)

Tryptoni	10,0 g
Hiiuvauute	3,0 g
Lihauute	1,5 g
Glukoosi	1,0 g
Agar	10,0 g–20,0 g
Tween 80	1 ml
Vesi	1 000 ml

pH 6,5 (steriloinnin jälkeen).

4.3 0,8 % (w/v) natriumkloridiliuos: liuotetaan 8 g natriumkloridia veteen, laimennetaan 1 000 ml:ksi ja steriloidaan.

4.4 Metanoli/vesi/kloorivetyhappo (4.6) -seos: 80/17,5/2,5 (v/v/v).

⁽¹⁾ 1 mg rehulaatuluokkaa olevaa sinkkibasitrasiiinia vastaa 42 kansainvälistä yksikköä (k.y.).

^(a) Voidaan käyttää muita menetelmiä edellyttäen, että niillä on osoitettu saatavan aikaan samanlaisia bakterisuspensioita.

^(b) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

4.5 Fosfaattipuskuriliuos, pH 6,5

Kaliumvetyfosfaatti, K_2HPO_4	22,15 g
Kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4	27,85 g
Vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.6 Kloorivetyhappo tiheys 1,18–1,19.

4.7 0,1 M kloorivetyhappo.

4.8 1 M natriumhydroksidiliuos.

4.9 Noin 0,5 M natriumsulfidiliuos.

4.10 0,04% (w/v) bromikresolipunaliuos: liuotetaan 0,1 g bromikresolipunaa 18,5 ml:aan 0,01 M natriumhydroksidiliuosta. Tilavuus säädetään 250 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan.

4.11 Standardiyhdiste: tunnetun aktiivisuuden (k.y.-yksikköinä) omaava sinkkibasitrasini.

5. Standardiliuokset

Punnitaan sellainen määrä sinkkibasitrasiniinistandardia (4.11), joka vastaa 1 050 k.y.:ä (annetun aktiivisuuden mukaan). Lisätään 5 ml 0,1 M kloorivetyhappoa (4.7) ja annetaan seistä 15 minuuttia. Lisätään 30 ml vettä, säädetään pH arvoon 4,5 fosfaattipuskurilla (4.5) (noin 4 ml), tilavuus säädetään 50 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan (1 ml = 21 k.y.).

Tästä liuksesta valmistetaan peräkkäin laimentaen fosfaattipuskuriliuksella, pH 6,5 (4.5), seuraavat liuokset:

s_8	0,42	k.y./ml
s_4	0,21	k.y./ml
s_2	0,105	k.y./ml
s_1	0,0525	k.y./ml

6. Uutteen valmistus

6.1 *Uutto*

6.1.1 Esiseokset ja kivennäisrehut

Punnitaan 2,0–5,0 g näytettä, lisätään 29,0 ml seosta (4.4) ja 1,0 ml natriumsulfidiliuosta (4.9) ja ravistellaan lyhyen aikaa. Tarkistetaan, että pH-arvo on noin 2. Ravistellaan 10 minuuttia, lisätään 30 ml fosfaattipuskuriliuosta (4.5), ravistellaan 15 minuuttia ja sentrifugoidaan. Otetaan sopiva määrä supernatanttia ja säädetään sen pH arvoon 6,5 1 M natriumhydroksidiliuksella (4.8) käyttäen pH-mittaria tai bromikresolipunaindikaattoria (4.10).

Laimennetaan fosfaattipuskuriliuksella (4.5), jotta oletetuksi sinkkibasitrasiinipitoisuudeksi saadaan 0,42 k.y./ml (= U_8).

6.1.2 Valkuaiskonsentraatit

Punnitaan 10 g näytettä, lisätään 49,0 ml seosta (4.4) ja 1,0 ml natriumsulfidiliuosta (4.9) ja ravistellaan lyhyen aikaa. Tarkistetaan, että pH-arvo on noin 2. Ravistellaan 10 minuuttia, lisätään 50 ml fosfaattipuskuriliuosta (4.5), ravistellaan 15 minuuttia ja sentrifugoidaan. Otetaan sopiva määrä supernatanttia ja säädetään sen pH arvoon 6,5 1 M natriumhydroksidiliuksella (4.8) käyttäen pH-mittaria tai bromikresolipunaindikaattoria (4.10).

Haihdutetaan noin puoleen alkuperäisestä tilavuudestaan pyöröhaiduttimessa lämpötilassa, joka ei ylitä 35 °C. Laimennetaan fosfaattipuskuriliuksella (4.5), jotta oletetuksi sinkkibasitrasiinipitoisuudeksi saadaan 0,42 k.y./ml (= U_8).

6.1.3 Muut rehut

Punnitaan 10 g näytettä (20 g, jos oletettu sinkkibasitrasiinipitoisuus on 5 mg/kg). Lisätään 24,0 ml seosta (4.4) ja 1,0 ml natriumsulfidiliuosta (4.9), homogenoidaan 10 minuuttia. Lisätään 25 ml fosfaattipuskuriliuosta (4.5), ravistellaan 15 minuuttia ja sentrifugoidaan. Otetaan 20 ml supernatanttia ja säädetään sen pH arvoon 6,5 1 M natriumhydroksidiliuksella käyttäen pH-mittaria tai bromikresolipunaindikaattoriliuosta (4.10). Haihdutetaan noin 4 ml:ksi pyöröhaiduttajassa lämpötilassa, joka ei ylitä 35 °C. Laimennetaan fosfaattipuskuriliuksella (4.5) siten, että oletetuksi sinkkibasitrasiinipitoisuudeksi saadaan 0,42 k.y./ml (= U_8).

6.2 Määrittelyliuokset

Valmistetaan U_8 -liuksesta liuokset U_4 (oletettu pitoisuus: 0,21 k.y./ml), U_2 (oletettu pitoisuus: 0,105 k.y./ml) ja U_1 (oletettu pitoisuus: 0,0525 k.y./ml) fosfaattipuskuriliuksella (4.5) peräkkäin laimentaen (1 + 1) fosfaattipuskuriin (4.5).

7. Määritelty menettely

7.1 Siirrostus määritysalueeseen

Bakteerisuspensio (3.2) siirrostetaan noin 50 °C:ssa määritysalueeseen (4.2). Alustasta (4.2) valmistetuilla maljoilla tehdään esikokeet, joilla määritetään eri sinkkibasitrasiniikkonsentraatioissa suurimmat ja kirkkaimmat inhibiitiovyöhykkeet antava bakteerisuspensiomäärä.

7.2 Maljojen valmistus

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen neljää standardiliuoskonsentraatiota (S_8, S_4, S_2, S_1) ja neljää määritysliuoskonsentraatiota (U_8, U_4, U_2, U_1). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä neljä uute- ja standardikonsentraatiota. Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agar-alustaan voidaan tehdä ainakin 8 reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm ja joiden keskustat ovat vähintään 30 mm:n päässä toisistaan. Voidaan käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Maljoille kaadetaan sellainen määrä 7.1 kohdan mukaisesti siirrostettua alustaa (4.2), joka muodostaa noin 2 mm paksun kerroksen (kun malja on vetoisuudeltaan 60 ml ja läpimitaltaan 200 mm). Jäähdytetään vaakasuoralla alustalla, alustaan tehdään reiät ja niihin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet määritys- ja standardiliuoskia (läpimitasta riippuen 0,10–0,15 ml/reikä). Kutakin pitoisuutta käytetään ainakin neljä kertaa siten, että kussakin määrittämisessä suoritetaan arviointi 32 inhibiitiovyöhykkeestä.

7.3 Inkubointi

Maljoja inkuboidaan 16–18 tuntia 30 ± 2 °C:ssa.

8. Laskeminen

Inhibiitiovyöhykkeiden läpimitta mitataan 0,1 mm:n tarkkuudella. Kutakin pitoisuutta vastaavien mittausten keskiarvoista piirretään puolilogaritimpaperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritimia inhibiitiovyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Piirretään sekä standardiliuosken että uutteen osalta parhaita sovitusta edustavat suorat esimerkiksi seuraavasti:

Parhaita sovitusta edustava piste pienimmän standardipitoisuuden (SL) osalta määritetään käyttäen kaavaa:

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

Parhaita sovitusta edustava piste suurimman standardipitoisuuden (SH) osalta määritetään käyttäen kaavaa:

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

Parhaimman sovituksen omaavat pisteet lasketaan samoin uutteen pienimmän pitoisuuden (UL) ja uutteen suurimman pitoisuuden (UH) osalta korvaamalla yllä olevissa kaavoissa S_1, S_2, S_4 ja S_8 U_1 :lla, U_2 :lla, U_4 :lla ja U_8 :lla.

Lasketut SL- ja SH-arvot merkitään samalle kuvaajapaperille ja ne yhdistetään parhaimman sovituksen omaavan suoran muodostamiseksi standardiliuosken osalta. Samoin merkitään UL- ja UH-arvot ja ne yhdistetään parhaimman sovituksen omaavan suoran muodostamiseksi uutteen osalta.

Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, suorien pitäisi olla yhdensuuntaiset. Käytännössä suoraa voidaan pitää yhdensuuntaisena, jos arvot (SH–SL) ja (UH–UL) eivät poikkea keskiarvostaan yli 10 %.

Jos suorat eivät ole yhdensuuntaiset, joko U_1 ja S_1 tai U_8 ja S_8 voidaan hylätä ja SL, SH, UL ja UH laskea käyttäen vaihtoehtoisia kaavoja vaihtoehtoisten parhaimman sovituksen omaavien suorien muodostamiseksi:

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

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

ja käyttäen samoja kaavoja UL:n ja UH:n tapauksissa. Yhdensuuntaisuuden on oltava samojen periaatteiden mukainen. Tulosten laskeminen kolmen pitoisuuden perusteella on mainittava määrittämiselosteessa.

Kun suoria pidetään yhdensuuntaisina, suhteellisen aktiivisuuden logaritmi ($\log A$) lasketaan jollakin seuraavista kaavoista sen mukaan, määritetäänkö yhdensuuntaisuus kolmella vai neljällä pitoisuudella:

Neljän pitoisuuden osalta

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

Kolmen pitoisuuden osalta

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

tai

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

Näytteestä saadun uutteen aktiivisuus = vastaavan standardin aktiivisuus $\times A$

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

Jos suhteellisen aktiivisuuden havaitaan olevan alueen 0,5–2,0 ulkopuolella, määrittäminen suoritetaan uudelleen siten, että uutteen konsentraatiot säädetään sopiviksi tai, jos tämä ei ole mahdollista, standardiliuosten konsentraatiot säädetään sopiviksi. Kun suhteellista aktiivisuutta ei saada tuotua vaaditulle alueelle, on mikä tahansa saatu tulos katsottava likimääräiseksi ja tämä on mainittava määrittäselosteessa.

Kun suoria ei pidetä yhdensuuntaisina, määrittäminen toistetaan. Jos yhdensuuntaisuutta ei vieläkaan saada aikaan, määrittäystä ei voi pitää hyväksyttävänä.

Tulokset ilmoitetaan milligrammoina sinkkibasitrasiniin rehukiloa kohden.

9. Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritettujen kahden rinnakkaismäärittäksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

2 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, korkeintaan 10 mg/kg olevien sinkkibasitrasiniipitoisuuksien osalta;

20 %, suurimpaan arvoon verrattuna, välillä 10–25 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta;

5 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, välillä 25–50 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta;

10 %, suurimpaan arvoon verrattuna, yli 50 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta.”