

## II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

## COMMISSION

## DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 20 décembre 1983

**modifiant les directives 71/393/CEE, 72/199/CEE et 78/633/CEE portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux**

(84/4/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive 70/373/CEE du Conseil, du 20 juillet 1970, concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux<sup>(1)</sup>, modifiée en dernier lieu par l'acte d'adhésion de la Grèce, et notamment son article 2,

considérant que les directives 71/393/CEE<sup>(2)</sup>, 72/199/CEE<sup>(3)</sup> et 78/633/CEE<sup>(4)</sup> de la Commission fixent respectivement les méthodes de dosage des matières grasses brutes, de la virginiamycine et de la bacitracine-zinc; qu'il apparaît nécessaire de remplacer ces méthodes par des méthodes adaptées à l'évolution des connaissances scientifiques et techniques;

considérant que les mesures prévues à la présente directive sont conformes à l'avis du comité permanent des aliments des animaux,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

*Article premier*

À l'annexe de la directive 71/393/CEE, le texte de la partie 4, « Dosage des matières grasses brutes », est

remplacé par le texte figurant à l'annexe I de la présente directive.

*Article 2*

À l'annexe II de la directive 72/199/CEE, le texte de la partie 5, « Dosage de la virginiamycine — par diffusion sur gélose », est remplacé par le texte figurant à l'annexe II de la présente directive.

*Article 3*

À l'annexe de la directive 78/633/CEE, le texte de la partie 1, « Dosage de la bacitracine-zinc — par diffusion sur gélose », est remplacé par le texte figurant à l'annexe III de la présente directive.

*Article 4*

Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer aux dispositions de la présente directive au plus tard le 1<sup>er</sup> juin 1984 et ils en informent immédiatement la Commission.

*Article 5*

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 20 décembre 1983.

*Par la Commission*

Poul DALSGER

*Membre de la Commission*

<sup>(1)</sup> JO n° L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.

<sup>(2)</sup> JO n° L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.

<sup>(3)</sup> JO n° L 123 du 29. 5. 1972, p. 6.

<sup>(4)</sup> JO n° L 206 du 29. 7. 1978, p. 43.

## ANNEXE I

## 4. DOSAGE DES MATIÈRES GRASSES BRUTES

1. **Objet et domaine d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en matières grasses brutes des aliments des animaux. Elle ne concerne pas l'analyse des graines et fruits oléagineux définis dans le règlement n° 136/66/CEE du Conseil du 22 septembre 1966.

Selon la nature de l'aliment, l'un ou l'autre des procédés décrits ci-après doit être appliqué.

1.1. *Procédé A*

Applicable aux aliments simples d'origine végétale, à l'exception de ceux qui sont connus comme contenant des matières grasses qui ne sont pas complètement extractibles par l'éther de pétrole sans hydrolyse préalable. Appartiennent à ces exceptions les glutens, les levures, les protéines de soja et de pommes de terre. Ce procédé est également applicable aux aliments composés, à l'exception de ceux qui contiennent de la poudre de lait ou dont les matières grasses ne sont pas complètement extractibles par l'éther de pétrole sans hydrolyse préalable.

1.2. *Procédé B*

Applicable aux aliments simples d'origine animale ainsi qu'aux aliments mentionnés sous le point 1.1 comme exceptions à l'application du procédé A.

2. **Principe**2.1. *Procédé A*

L'échantillon est extrait par de l'éther de pétrole. Le solvant est distillé et le résidu est séché et pesé.

2.2. *Procédé B*

L'échantillon est traité à chaud par de l'acide chlorhydrique. Le mélange est refroidi et filtré. Après avoir été lavé et séché, le résidu est soumis à l'analyse selon le procédé A.

3. **Réactifs**

3.1. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition : 40 à 60 °C. L'indice de brome doit être inférieur à 1 et le résidu d'évaporation inférieur à 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfate de sodium, anhydre.

3.3. Acide chlorhydrique 3 N.

3.4. Adjuvant de filtration, par exemple terre de diatomée, Hyflo-supercel.

4. **Appareillage**

4.1. Extracteur. Si l'appareil est muni d'un siphon (appareil de Soxhlet), le débit du reflux doit être réglé de façon à obtenir 10 cycles au moins par heure. S'il s'agit d'un appareil sans siphon, le débit de liquide reflué doit être de 10 ml environ par minute.

4.2. Cartouches d'extraction, exemptes de matières solubles dans l'éther de pétrole, dont la porosité est compatible avec les exigences du point 4.1.

4.3. Étuve à dessiccation, soit par le vide à 75 °C ± 3 °C, soit à pression atmosphérique à 100 °C ± 3 °C.

5. **Mode opératoire**5.1. *Procédé A* (voir observation 8.1)

Peser, à 1 mg près, 5 g de l'échantillon, les introduire dans une cartouche à extraction (4.2) et les recouvrir d'un tampon de coton dégraissé.

Placer la cartouche dans un extracteur (4.1) et extraire durant six heures par de l'éther de pétrole (3.1). Recueillir l'extrait dans un ballon sec, muni de quelques fragments de pierre ponce<sup>(1)</sup> et taré.

Éliminer le solvant par distillation. Sécher le résidu en plaçant le ballon pendant une heure et demie dans une étuve à dessiccation (4.3). Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Sécher à nouveau pendant trente minutes pour s'assurer que le poids de la matière grasse reste constant (la perte de poids entre deux pesées successives doit être inférieure à 1 mg).

<sup>(1)</sup> Remplacer les fragments de pierre ponce par des perles de verre lorsque la matière grasse doit faire l'objet d'examen qualitatifs ultérieurs.

### 5.2. Procédé B

Peser, à 1 mg près, 2,5 g de l'échantillon (voir observation 8.2), les introduire dans un cylindre de 400 ml ou une fiole conique de 300 ml et ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique 3 N (33) et quelques fragments de pierre ponce. Recouvrir le cylindre d'un verre de montre ou munir la fiole conique d'un réfrigérant à reflux. Amener le mélange à ébullition douce, à l'aide d'une petite flamme ou d'une plaque chauffante, et l'y maintenir durant une heure. Éviter que le produit adhère aux parois du récipient.

Refroidir et ajouter une quantité d'adjuvant de filtration (3.4) suffisante pour éviter toute perte de matière grasse lors de la filtration. Filtrer sur un double papier filtre mouillé, exempt de matières grasses. Laver le résidu à l'eau froide jusqu'à neutralité du filtrat. Vérifier que le filtrat ne contient pas de matières grasses. La présence de celles-ci indique qu'une extraction de l'échantillon par l'éther de pétrole, selon le procédé A, doit être effectuée préalablement à l'hydrolyse.

Placer le double papier-filtre contenant le résidu sur un verre de montre et sécher durant une heure et demie dans l'étuve à  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Introduire le double papier-filtre contenant le résidu sec dans une cartouche à extraction (4.2) et le recouvrir d'un tampon de coton dégraissé. Placer la cartouche dans un extracteur (4.1) et poursuivre le mode opératoire comme indiqué en 5.1, deuxième et troisième alinéas.

### 6. Calcul des résultats

Exprimer le résultat de la pesée en parts pour cent d'échantillon.

### 7. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur un même échantillon par le même analyste ne doit pas dépasser :

0,2 %, en valeur absolue, pour les teneurs en matières grasses brutes inférieures à 5 %,

4,0 % du résultat le plus élevé pour les teneurs de 5 à 10 %,

0,4 %, en valeur absolue, pour les teneurs supérieures à 10 %.

### 8. Observations

8.1. Pour les produits à teneur élevée en matières grasses, difficiles à broyer ou non appropriés au prélèvement d'une prise d'essai réduite homogène, procéder comme suit.

Peser, à 1 mg près, 20 g de l'échantillon et les mélanger à 10 g ou plus de sulfate de sodium anhydre (3.2). Extraire par l'éther de pétrole (3.1) comme indiqué en 5.1. Compléter l'extrait obtenu à 500 ml avec de l'éther de pétrole (3.1) et homogénéiser. Introduire 50 ml de la solution dans un petit ballon sec, muni de quelques fragments de pierre ponce<sup>(1)</sup> et taré. Éliminer le solvant par distillation, sécher et poursuivre le mode opératoire comme indiqué en 5.1 dernier alinéa.

Éliminer le solvant du résidu d'extraction se trouvant dans la cartouche, broyer le résidu à la finesse de 1 mm, le placer à nouveau dans la cartouche (ne pas ajouter de sulfate de sodium) et poursuivre le mode opératoire comme indiqué en 5.1, deuxième et troisième alinéas.

La teneur en matières grasses brutes en parts pour cent d'échantillon est donnée par la formule :

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

dans laquelle :

a = masse, en grammes, du résidu de la première extraction (partie aliquote de l'extrait),

b = masse, en grammes, du résidu de la seconde extraction.

8.2. La prise d'essai des produits pauvres en matières grasses peut être portée à 5 g. »

<sup>(1)</sup> Remplacer les fragments de pierre ponce par des perles de verre lorsque la matière grasse doit faire l'objet d'examens qualitatifs ultérieurs.

## ANNEXE II

## 5. DOSAGE DE LA VIRGINIAMYCINE

— par diffusion sur gélose —

1. **Objet et domaine d'application**

La méthode permet de doser la virginiamycine dans les aliments et les prémélanges. La limite inférieure du dosage est de 2 mg/kg (2 ppm)<sup>(1)</sup>.

2. **Principe**

L'échantillon est soumis à une extraction par une solution méthanolique de Tween 80. L'extrait est décanté ou centrifugé, puis dilué. Son activité antibiotique est déterminée par mesure de la diffusion de la virginiamycine dans un milieu gélosé, ensemencé avec *Micrococcus luteus*. La diffusion se révèle par la formation de zones d'inhibition du micro-organisme. Le diamètre de ces zones est considéré comme étant directement proportionnel au logarithme de la concentration en antibiotique pour la gamme des concentrations utilisées.

3. **Micro-organisme : "Micrococcus luteus" ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**3.1. *Entretien de la souche*

Ensemencer le milieu de culture (4.1), en tubes inclinés, par *Micrococcus luteus*. Incuber pendant vingt-quatre heures à 30 °C, conserver en réfrigérateur à 4 °C environ et renouveler l'ensemencement tous les quinze jours.

3.2. *Préparation de la suspension bactérienne(a)*

Récolter les germes d'un tube de gélose (3.1), de préparation récente, à l'aide de 2 à 3 ml de solution de chlorure de sodium (4.3). Ensemencer avec cette suspension 250 ml du milieu de culture (4.1) dans une fiole de Roux et incuber pendant dix-huit à vingt heures à 30 °C. Récolter les germes dans 25 ml de solution de chlorure de sodium (4.3) et homogénéiser.

Diluer la suspension à 1/10 à l'aide de la solution de chlorure de sodium (4.3). La transmission lumineuse de la suspension, mesurée à 650 nm sous une épaisseur de 1 cm par comparaison avec la solution de chlorure de sodium (4.3), doit être de 75 % environ. Cette suspension peut être conservée une semaine à 4 °C environ.

4. **Milieus de culture et réactifs**4.1. *Milieu d'entretien de la souche et de base du dosage(b)*

Peptone de viande	6,0 g
Tryptone	4,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Extrait de viande	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gélose	10,0 à 20,0 g
Eau	1 000 ml
pH 6,5 (après stérilisation)	

4.2. *Tampon phosphate, pH 6*

Hydrogenophosphate de potassium, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Dihydrogenophosphate de potassium, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0 g
Eau jusqu'à	1 000 ml

## 4.3. Solution à 0,8 % (p/v) de chlorure de sodium : dissoudre dans l'eau 8 g de chlorure de sodium, diluer à 1 000 ml et stériliser.

## 4.4. Méthanol.

## 4.5. Mélange de tampon phosphate (4.2) et de méthanol (4.4) : 80/20 (v/v).

## 4.6. Solution méthanolique à 0,5 % (p/v) de Tween 80 : dissoudre 5 g de Tween 80 dans du méthanol (4.4) et diluer à 1 000 ml avec du méthanol.

## 4.7. Substance étalon : virginiamycine d'activité connue.

<sup>(1)</sup> 1 mg de virginiamycine équivaut à 1 000 unités "UK".

(a) D'autres méthodes peuvent être utilisées dans la mesure où il est prouvé qu'elles produisent des suspensions bactériennes analogues.

(b) Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

## 5. Solutions étalons

Dissoudre une quantité exactement pesée de la substance étalon (4.7) dans le méthanol (4.4) et diluer avec du méthanol (4.4) pour obtenir une solution mère à 1 000 µg de virginiamycine/ml. Conservée en flacon bouché à 4 °C, cette solution est stable pendant cinq jours.

Préparer à partir de cette solution et par dilutions successives à l'aide du mélange (4.5) les solutions suivantes :

S <sub>8</sub>	1	µg/ml
S <sub>4</sub>	0,5	µg/ml
S <sub>2</sub>	0,25	µg/ml
S <sub>1</sub>	0,125	µg/ml

## 6. Préparation de l'extrait et des solutions

### 6.1. Extraction

#### 6.1.1. Produits dont la teneur en virginiamycine ne dépasse pas 100 mg/kg

Peser une quantité d'échantillon de 50,0 g. Ajouter 200 ml de solution (4.6), agiter durant trente minutes, puis laisser déposer ou centrifuger. Prélever 20 ml de la solution surnageante et évaporer jusqu'à 5 ml dans un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 40 °C. Diluer le résidu à l'aide du mélange (4.5) pour obtenir une concentration présumée en virginiamycine de 1 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

#### 6.1.2. Produits dont la teneur en virginiamycine est supérieure à 100 mg/kg

Peser une quantité d'échantillon ne dépassant pas 10,0 g et contenant de 1 à 50 mg de virginiamycine. Ajouter 100 ml de solution (4.6), agiter durant trente minutes, puis laisser déposer ou centrifuger. Diluer la solution surnageante à l'aide du mélange (4.5) pour obtenir une concentration en virginiamycine de 1 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

### 6.2. Solutions de l'extrait

Préparer à partir de la solution U<sub>8</sub> et par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.5) les solutions U<sub>4</sub> (concentration présumée : 0,5 µg/ml), U<sub>2</sub> (concentration présumée : 0,25 µg/ml) et U<sub>1</sub> (concentration présumée : 0,125 µg/ml).

## 7. Modalités du dosage

### 7.1. Inoculation du milieu de culture

Ensemencer à 50 °C environ le milieu de base du dosage (4.1) par la suspension bactérienne (3.2). Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu (4.1), déterminer la quantité de suspension bactérienne permettant d'obtenir pour les différentes concentrations en virginiamycine des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes.

### 7.2. Préparation des boîtes

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les quatre concentrations de la solution étalon (S<sub>8</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>) et les quatre concentrations de l'extrait (U<sub>8</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>2</sub>, U<sub>1</sub>). Chaque boîte doit nécessairement recevoir les quatre concentrations de l'étalon et de l'extrait. À cet effet, choisir la dimension des boîtes de telle sorte qu'on puisse creuser dans le milieu gélosé au moins huit cavités de 10 à 13 mm de diamètre, dont les centres ne sont pas distants de moins de 30 mm. On peut utiliser comme boîtes des plaques de verre planes, surmontées d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire dans les boîtes une quantité du milieu (4.1), ensemencé comme indiqué en 7.1, permettant d'obtenir une couche de 2 mm environ d'épaisseur (60 ml pour une boîte de 200 mm de diamètre). Laisser solidifier, creuser les cavités et y déposer des volumes exactement mesurés des solutions de l'étalon et de l'extrait (0,10 à 0,15 ml par cavité, selon le diamètre). Faire au moins quatre répétitions de chaque concentration de façon que chaque détermination fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

### 7.3. Incubation

Incuber les boîtes pendant seize à dix-huit heures à 30 °C ± 2 °C.

## 8. Évaluation

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition à 0,1 mm près. Pour chaque concentration, enregistrer les mesures moyennes sur papier semi-logarithmique en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites les mieux ajustées pour la solution étalon et pour l'extrait en procédant, par exemple, comme suit :

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus bas de la solution étalon (SL) à l'aide de la formule :

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

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus élevé de la solution-étalon (SH) à l'aide de la formule :

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

Déterminer de la même façon les points les plus appropriés de l'extrait pour le niveau le plus bas (UL) et le niveau le plus élevé (UH) en remplaçant  $s_1, s_2, s_4$  et  $s_8$  dans les formules susmentionnées par  $u_1, u_2, u_4$  et  $u_8$ .

Inscrire les valeurs SL et SH sur le même graphique. En joignant les deux points on obtient la droite la mieux ajustée pour la solution étalon. En procédant de la même façon pour UL et UH on obtient la droite la mieux ajustée pour l'extrait.

En l'absence de toute interférence, les droites devraient être parallèles. En pratique, on les considère comme étant parallèles lorsque  $(\text{SH} - \text{SL})$  et  $(\text{UH} - \text{UL})$  ne diffèrent pas de plus de 10 % de leur moyenne.

Si les droites ne sont pas parallèles, on peut éliminer soit  $u_1$  et  $s_1$ , soit  $u_8$  et  $s_8$ . Les valeurs SL, SH, UL et UH permettant d'obtenir les droites les mieux ajustées sont alors calculées à l'aide des formules suivantes :

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

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

et de formules analogues pour UL et UH. L'utilisation de cette alternative impose que les mêmes critères de parallélisme soient respectés.

L'obtention d'un résultat provenant de trois niveaux doit être mentionnée sur le bulletin d'analyse.

Lorsque les droites sont considérées comme étant parallèles, calculer le logarithme de l'activité relative ( $\log. A$ ) par l'une des formules ci-après, selon le nombre de niveaux (4 ou 3) utilisés pour l'évaluation du parallélisme.

Pour 4 niveaux :

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

Pour 3 niveaux :

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

ou

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

Activité de l'extrait de l'échantillon = activité de l'étalon correspondant  $\times A$  :

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

Si l'activité relative se trouve en dehors de la gamme des valeurs comprises entre 0,5 et 2,0, répéter la détermination en procédant à des ajustements appropriés des concentrations de l'extrait ou, éventuellement, des solutions étalons. Lorsque cette activité ne peut être ramenée dans la gamme des valeurs requises, le résultat doit être considéré comme approximatif et cette indication doit être notée sur le bulletin d'analyse.

Lorsque les droites sont considérées comme n'étant pas parallèles, répéter la détermination. Si le parallélisme n'est toujours pas atteint, la détermination doit être considérée comme non satisfaisante.

Exprimer le résultat en milligrammes de virginiamycine par kilogramme d'aliment.

**9. Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur le même échantillon par le même analyste ne doit pas dépasser :

2 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en virginiamycine inférieures à 10 mg/kg,

20 % du résultat le plus élevé pour les teneurs de 10 à 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs de 25 à 50 mg/kg,

10 % du résultat le plus élevé pour les teneurs supérieures à 50 mg/kg. »

---

## ANNEXE III

## 1. DOSAGE DE LA BACITRACINE-ZINC

— par diffusion sur gélose —

1. **Objet et domaine d'application**

La méthode permet de doser la bacitracine-zinc dans les aliments et les prémélanges. La limite inférieure du dosage est de 5 mg/kg (5 ppm)<sup>(1)</sup>.

2. **Principe**

L'échantillon est extrait à pH 2 par un mélange de méthanol, d'eau et d'acide chlorhydrique et une solution de sulfure de sodium. Le sulfure de sodium permet de précipiter les sels de cuivre solubles pouvant interférer dans la détermination. L'extrait amené à pH 6,5 est concentré (si nécessaire) et dilué. Son activité antibiotique est déterminée par mesure de la diffusion de la bacitracine-zinc dans un milieu gélosé, ensemencé avec *Micrococcus luteus (flavus)*. La diffusion se révèle par la formation de zones d'inhibition du micro-organisme. Le diamètre de ces zones est considéré comme étant directement proportionnel au logarithme de la concentration en antibiotique pour la gamme des concentrations utilisées.

3. **Micro-organisme : "Micrococcus luteus (flavus)" ATCC 10240**3.1. *Entretien de la souche*

Ensemencer le milieu de culture (4.1), en tubes inclinés, par *Micrococcus luteus (flavus)*. Incuber pendant vingt-quatre heures à 30 °C, conserver en réfrigérateur à 4 °C environ et renouveler l'ensemencement tous les quinze jours.

3.2. *Préparation de la suspension bactérienne(a)*

Récolter les germes d'un tube de gélose (3.1), de préparation récente, à l'aide de 2 à 3 ml de solution de chlorure de sodium (4.3). Ensemencer avec cette suspension 250 ml du milieu de culture (4.1) dans une fiole de Roux et incuber pendant dix-huit à vingt heures à 30 °C. Récolter les germes dans 25 ml de solution de chlorure de sodium (4.3) et homogénéiser.

Diluer la suspension à 1/10 à l'aide de la solution de chlorure de sodium (4.3). La transmission lumineuse de la suspension, mesurée à 650 nm sous une épaisseur de 1 cm par comparaison avec la solution de chlorure de sodium (4.3), doit être de 75 % environ. Cette suspension peut être conservée une semaine à 4 °C environ.

4. **Milieus de culture et réactifs**4.1. *Milieu d'entretien de la souche(b)*

Peptone de viande	6,0 g
Tryptone	4,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Extrait de viande	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gélose	10,0 à 20,0 g
Eau	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (après stérilisation)	

4.2. *Milieu de base du dosage(b)*

Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Extrait de viande	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gélose	10,0 à 20,0 g
Tween 80	1 ml
Eau	1 000 ml
pH 6,5 (après stérilisation)	

## 4.3. Solution à 0,8 % (p/v) de chlorure de sodium : dissoudre dans l'eau 8 g de chlorure de sodium, diluer à 1 000 ml et stériliser.

## 4.4. Mélange de méthanol/eau/acide chlorhydrique (4.6) : 80/17,5/2,5 (v/v/v).

<sup>(1)</sup> 1 mg de bacitracine-zinc (qualité pour aliments des animaux) équivaut à 42 unités internationales (UI).

(a) D'autres méthodes peuvent être utilisées dans la mesure où il est prouvé qu'elles produisent des suspensions bactériennes analogues.

(b) Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

- 4.5. *Tampon phosphate, pH 6,5*
- |                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| Phosphate bipotassique $K_2HPO_4$   | 22,15 g  |
| Phosphate monopotassique $KH_2PO_4$ | 27,85 g  |
| Eau jusqu'à                         | 1 000 ml |
- 4.6. Acide chlorhydrique, d: 1,18-1,19
- 4.7. Acide chlorhydrique, 0,1 M
- 4.8. Solution 1 M d'hydroxyde de sodium
- 4.9. Solution 0,5 M environ de sulfure de sodium
- 4.10. Solution à 0,04 % (p/v) de pourpre de bromocrésol :  
dissoudre 0,1 g de pourpre de bromocrésol dans 18,5 ml de solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium. Compléter à 250 ml avec de l'eau et homogénéiser.
- 4.11. Substance étalon : bacitracine-zinc d'activité connue (en UI).

## 5. Solutions étalons

Peser une quantité de substance étalon (4.11) correspondant à 1 050 UI (selon le titre indiqué). Ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M (4.7) et laisser reposer quinze minutes. Ajouter 30 ml d'eau, ajuster le pH à 4,5 à l'aide du tampon phosphate (4.5) (4 ml environ), compléter à 50 ml avec de l'eau et homogénéiser (1 ml = 21 UI).

Préparer à partir de cette solution et par dilutions successives à l'aide du tampon phosphate pH 6,5 (4.5) les solutions suivantes :

$S_8$	0,42	UI/ml
$S_4$	0,21	UI/ml
$S_2$	0,105	UI/ml
$S_1$	0,0525	UI/ml

## 6. Préparation de l'extrait

### 6.1. Extraction

#### 6.1.1. Prémélanges et aliments minéraux

Peser une quantité d'échantillon de 2,0 à 5,0 g, ajouter 29,0 ml du mélange (4.4) et 1,0 ml de solution de sulfure de sodium (4.9); agiter brièvement. Vérifier que le pH est de 2 environ. Agiter durant dix minutes, ajouter 30 ml de tampon phosphate (4.5), agiter durant quinze minutes et centrifuger. Prélever une partie aliquote de la solution surnageante et amener le pH à 6,5 à l'aide de la solution 1 M d'hydroxyde de sodium (4.8) en utilisant un pH-mètre ou la solution de pourpre de bromocrésol (4.10) comme indicateur.

Diluer à l'aide du tampon phosphate (4.5) pour obtenir une concentration présumée en bacitracine-zinc de 0,42 UI/ml (=  $U_8$ ).

#### 6.1.2. Concentrés protéiniques

Peser une quantité d'échantillon de 10,0 g, ajouter 49,0 ml du mélange (4.4) et 1,0 ml de la solution de sulfure de sodium (4.9); agiter brièvement. Vérifier que le pH est de 2 environ. Agiter durant dix minutes, ajouter 50 ml du tampon phosphate (4.5), agiter durant quinze minutes et centrifuger. Prélever une partie aliquote de la solution surnageante et amener le pH à 6,5 à l'aide de la solution 1 M d'hydroxyde de sodium (4.8) en utilisant un pH-mètre ou la solution de pourpre de bromocrésol (4.10) comme indicateur.

Évaporer approximativement la moitié du volume dans un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 35 °C. Diluer à l'aide du tampon phosphate (4.5) pour obtenir une concentration présumée en bacitracine-zinc de 0,42 UI/ml (=  $U_8$ ).

#### 6.1.3. Autres aliments

Peser une quantité d'échantillon de 10,0 g (20,0 g pour une concentration présumée en bacitracine-zinc de 5 mg/kg). Ajouter 24,0 ml du mélange (4.4) et 1,0 ml de la solution de sulfure de sodium (4.9); homogénéiser durant dix minutes. Ajouter 25 ml de tampon phosphate (4.5), agiter durant quinze minutes et centrifuger. Prélever 20 ml de la solution surnageante et ajuster le pH à 6,5 à l'aide de la solution 1 M d'hydroxyde de sodium (4.8) en utilisant un pH-mètre ou la solution de pourpre de bromocrésol (4.10) comme indicateur. Évaporer jusqu'à 4 ml environ dans un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 35 °C. Diluer le résidu à l'aide du tampon phosphate (4.5) pour obtenir une concentration présumée en bacitracine-zinc de 0,42 UI/ml (=  $U_8$ ).

### 6.2. Solutions de l'extrait

Préparer à partir de la solution  $U_8$  et par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du tampon phosphate (4.5), les solutions  $U_4$  (concentration présumée : 0,21 UI/ml),  $U_2$  (concentration présumée : 0,105 UI/ml) et  $U_1$  (concentration présumée : 0,0525 UI/ml).

## 7. Modalités du dosage

### 7.1. Inoculation du milieu de culture

Ensemencer à 50 °C environ le milieu de base du dosage (4.2) par la suspension bactérienne (3.2). Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu (4.2), déterminer la quantité de suspension bactérienne permettant d'obtenir pour les différentes concentrations en bacitracine-zinc des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes.

### 7.2. Préparation des boîtes

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les quatre concentrations de la solution étalon ( $S_8, S_4, S_2, S_1$ ) et les quatre concentrations de l'extrait ( $U_8, U_4, U_2, U_1$ ). Chaque boîte doit nécessairement recevoir les quatre concentrations de l'étalon et de l'extrait. À cet effet, choisir la dimension des boîtes de telle sorte qu'on puisse creuser dans le milieu gélosé au moins huit cavités de 10 à 13 mm de diamètre, dont les centres ne sont pas distants de moins de 30 mm. On peut utiliser comme boîtes des plaques de verre planes, surmontées d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire dans les boîtes une quantité du milieu (4.2), ensemencé comme indiqué en 7.1, permettant d'obtenir une couche de 2 mm environ d'épaisseur (60 ml pour une boîte de 200 mm de diamètre). Laisser solidifier, creuser les cavités et y déposer des volumes exactement mesurés des solutions de l'étalon et de l'extrait (0,10 à 0,15 ml par cavité, selon le diamètre). Faire au moins quatre répétitions de chaque concentration de façon que chaque détermination fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

### 7.3. Incubation

Incuber les boîtes pendant seize à dix-huit heures à 30 °C ± 2 °C.

## 8. Évaluation

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition à 0,1 mm près. Pour chaque concentration, enregistrer les mesures moyennes sur papier semi-logarithmique en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites les mieux ajustées pour la solution étalon et pour l'extrait en procédant, par exemple, comme suit :

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus bas de la solution étalon (SL) à l'aide de la formule :

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

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus élevé de la solution étalon (SH) à l'aide de la formule :

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

Déterminer de la même façon les points les plus appropriés de l'extrait pour le niveau le plus bas (UL) et le niveau le plus élevé (UH) en remplaçant  $S_1, S_2, S_4$  et  $S_8$  dans les formules susmentionnées par  $U_1, U_2, U_4$  et  $U_8$ .

Inscrire les valeurs SL et SH sur le même graphique. En joignant les deux points on obtient la droite la mieux ajustée pour la solution étalon. En procédant de la même façon pour UL et UH on obtient la droite la mieux ajustée pour l'extrait.

En l'absence de toute interférence, les droites devraient être parallèles. En pratique, on les considère comme étant parallèles lorsque  $(SH - SL)$  et  $(UH - UL)$  ne diffèrent par de plus de 10 % de leur moyenne.

Si les droites ne sont pas parallèles, on peut éliminer soit  $U_1$  et  $S_1$ , soit  $U_8$  et  $S_8$ . Les valeurs SL, SH, UL et UH permettant d'obtenir les droites les mieux ajustées sont alors calculées à l'aide des formules suivantes :

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

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

et de formules analogues pour UL et UH. L'utilisation de cette alternative impose que les mêmes critères de parallélisme soient respectés. L'obtention d'un résultat provenant de trois niveaux doit être mentionnée sur le bulletin d'analyse.

Lorsque les droites sont considérées comme étant parallèles, calculer le logarithme de l'activité relative (log. A) par l'une des formules ci-après, selon le nombre de niveaux (4 ou 3) utilisés pour l'évaluation du parallélisme.

Pour 4 niveaux :

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

Pour 3 niveaux :

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

ou

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

Activité de l'extrait de l'échantillon = activité de l'étalon correspondant  $\times A$  :

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

Si l'activité relative se trouve en dehors de la gamme des valeurs comprises entre 0,5 et 2,0, répéter la détermination en procédant à des ajustements appropriés des concentrations de l'extrait ou, éventuellement, des solutions étalons. Lorsque cette activité ne peut être ramenée dans la gamme des valeurs requises, le résultat doit être considéré comme approximatif et cette indication doit être notée sur le bulletin d'analyse.

Lorsque les droites sont considérées comme n'étant pas parallèles, répéter la détermination. Si le parallélisme n'est toujours pas atteint, la détermination doit être considérée comme non satisfaisante.

Exprimer le résultat en milligrammes de bacitracine-zinc par kilogramme d'aliment.

#### 9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon par le même analyste ne doit pas dépasser :

2 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en bacitracine-zinc inférieures à 10 mg/kg,

20 % du résultat le plus élevé pour les teneurs de 10 à 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs de 25 à 50 mg/kg,

10 % du résultat le plus élevé pour les teneurs supérieures à 50 mg/kg. \*