

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 20 dicembre 1983

che modifica le direttive 71/393/CEE, 72/199/CEE e 78/633/CEE che fissano i metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali

(84/4/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali⁽¹⁾, modificata da ultimo dall'atto di adesione della Grecia, in particolare l'articolo 2,

considerando che le direttive 71/393/CEE⁽²⁾, 72/199/CEE⁽³⁾ e 78/633/CEE della Commissione⁽⁴⁾ fissano rispettivamente i metodi di determinazione delle sostanze grasse gregge e di dosaggio della virginiamicina e della zinco-bacitracina; che è necessario sostituire tali metodi con metodi adattati all'evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecniche;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente degli alimenti per animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Nell'allegato della direttiva 71/393/CEE, il testo della parte 4 « Determinazione delle sostanze grasse gregge » è sostituito dal testo figurante nell'allegato I della presente direttiva.

Articolo 2

Nell'allegato II della direttiva 72/199/CEE, il testo della parte 5 « Dosaggio della virginiamicina — per diffusione in agar » è sostituito dal testo figurante nell'allegato II della presente direttiva.

Articolo 3

Nell'allegato della direttiva 78/633/CEE, il testo della parte 1 « Dosaggio della zinco-bacitracina — per diffusione in agar » è sostituito dal testo figurante nell'allegato III della presente direttiva.

Articolo 4

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva entro e non oltre il 1° giugno 1984. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 5

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 20 dicembre 1983.

Per la Commissione

Poul DALSAER

Membro della Commissione

⁽¹⁾ GU n. L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.

⁽²⁾ GU n. L 279 del 20. 12. 1971, pag. 7.

⁽³⁾ GU n. L 123 del 29. 5. 1972, pag. 6.

⁽⁴⁾ GU n. L 206 del 29. 7. 1978, pag. 43.

ALLEGATO I**4. DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE GRASSE GREGGE****1. Scopo e campo di applicazione**

Il metodo permette di determinare il contenuto in sostanze grasse gregge degli alimenti per gli animali. Il metodo non riguarda l'analisi dei semi e dei frutti oleosi previsti nel regolamento n. 136/66/CEE del Consiglio del 22 settembre 1966.

Dei due procedimenti sotto descritti, dovrà essere applicato il primo o il secondo in funzione della natura dell'alimento.

1.1. Procedimento A

Applicabile agli alimenti semplici di origine vegetale, salvo quelli riconosciuti come contenenti materie grasse che non possono essere completamente estratte con l'etere di petrolio senza idrolisi preliminare. Queste eccezioni comprendono i glutini, i lieviti, le proteine di soia e di patata. Questo procedimento è ugualmente applicabile agli alimenti composti, salvo quelli che contengono polvere di latte o le cui materie grasse non possono essere completamente estratte con l'etere di petrolio senza idrolisi preliminare.

1.2. Procedimento B

Applicabile agli alimenti semplici di origine animale, nonché agli alimenti citati nel precedente punto 1.1 come eccezioni all'applicazione del procedimento A.

2. Principio**2.1. Procedimento A**

Il campione è estratto con etere di petrolio. Il solvente viene eliminato ed il residuo viene essiccato e pesato.

2.2. Procedimento B

Il campione è trattato a caldo con acido cloridrico. La miscela viene raffreddata e filtrata. Dopo essere stato lavato ed essiccato, il residuo è sottoposto all'analisi secondo il procedimento A.

3. Reattivi

3.1. Etere di petrolio, con punto di ebollizione compreso fra 40 °C e 60 °C. L'indice di bromo deve essere inferiore a 1 ed il residuo di evaporazione inferiore a 2 mg/100 ml.

3.2. Solfato di sodio, anidro.

3.3. Acido cloridrico 3 N.

3.4. Coadiuvante di filtrazione, per esempio farina fossile, Hyflo-supercel.

4. Apparecchiatura

4.1. Estrattore. Se l'apparecchio è munito di un sifone (apparecchio di Soxhlet), la portata del riflusso deve essere regolata in modo da ottenere almeno 10 cicli l'ora. Se si tratta di un apparecchio senza sifone, il liquido deve rifluire in quantità pari a circa 10 ml al minuto.

4.2. Ditali da estrazione, esenti da sostanze solubili nell'etere di petrolio, la cui porosità sia compatibile con le esigenze di cui al punto 4.1.

4.3. Stufa per essiccazione nel vuoto a 75 °C ± 3 °C o a pressione atmosferica a 100 °C ± 3 °C.

5. Modo di operare**5.1. Procedimento A (punto 8.1)**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 5 g del campione; introdurli in un ditale da estrazione (4.2) e coprire con un tampone di cotone sgrassato.

Porre il ditale in un estrattore (4.1) ed estrarre per 6 ore con etere di petrolio (3.1). Raccogliere l'estratto in un pallone essiccato, contenente qualche granello di pietra pomice⁽¹⁾, e tarato.

Eliminare il solvente per distillazione. Essiccare il residuo introducendo il pallone in una stufa per essiccazione (4.3), lasciandovelo per un'ora e mezza. Lasciar raffreddare in un essiccatore e pesare. Essiccare una seconda volta per 30 minuti per assicurarsi che il peso della sostanza grassa rimanga costante (la perdita di peso tra due pesate successive deve essere inferiore a 1 mg).

⁽¹⁾ Sostituire i frammenti di pietra pomice con alcune palline di vetro, quando si debbano eseguire ulteriori esami qualitativi sulla sostanza grassa.

5.2. Procedimento B

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 2,5 g del campione (punto 8.2); introdurli in un becher da 400 ml o in una beuta da 300 ml ed aggiungere 100 ml di acido cloridrico 3 N (3.3) e qualche frammento di pietra pomice. Ricoprire il becher con un vetro da orologio o applicare sulla beuta un refrigerante a ricadere. Portare la miscela a lenta ebollizione su piccola fiamma o su piastra riscaldante e mantenerla per un'ora. Evitare che la sostanza aderisca alle pareti del recipiente.

Raffreddare ed aggiungere una quantità sufficiente di un coadiuvante di filtrazione (3.4) per evitare qualsiasi perdita di sostanza grassa durante la filtrazione. Filtrare su un doppio filtro di carta bagnato, esente da materie grasse. Lavare il residuo con acqua fredda fino a reazione neutra del filtrato. Verificare che il filtrato non contenga sostanze grasse. La presenza di queste nel filtrato indica che, prima dell'idrolisi, deve essere effettuata un'estrazione del campione con etere di petrolio, secondo il procedimento A.

Porre il doppio filtro con il residuo su un vetro da orologio ed essiccare per un'ora e mezza nella stufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Introdurre il doppio filtro con il residuo secco in un ditale da estrazione (4.2) e coprire con un tampone di cotone sgrassato. Porre il ditale in un estrattore (4.1) e proseguire come indicato al punto 5.1, secondo e terzo paragrafo.

6. Calcolo dei risultati

Esprimere il risultato della pesata in parti per cento del campione.

7. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non deve essere superiore a:

0,2 %, in valore assoluto, per i contenuti in materie grasse gregge inferiori a 5 %,

4,0 % del risultato più elevato, per i contenuti compresi fra 5 % e 10 %,

0,4 %, in valore assoluto, per i contenuti superiori a 10 %.

8. Osservazioni

8.1. Per i prodotti ad elevato tenore in sostanze grasse, difficili da macinare o non appropriati per il prelievo di una piccola quantità omogenea, procedere come segue:

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 20 g di campione e mescolarli con 10 g o più di solfato di sodio anidro (3.2). Procedere all'estrazione con etere di petrolio (3.1) come indicato al punto 5.1. Portare l'estratto ottenuto al volume di 500 ml con etere di petrolio (3.1) e mescolare. Introdurre 50 ml della soluzione in un palloncino essiccato, contenente qualche frammento di pietra pomice⁽¹⁾, e tarato. Eliminare il solvente per distillazione, essiccare e proseguire come indicato al punto 5.1, ultimo paragrafo.

Eliminare il solvente dal residuo dell'estrazione che si trova nel ditale, macinare il residuo alla finezza di 1 mm, porlo nuovamente nel ditale (non aggiungere solfato di sodio) e proseguire come indicato al punto 5.1, secondo e terzo paragrafo.

Il contenuto in materie grasse gregge in parti per cento del campione è dato dalla formula:

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

nella quale

a = massa, in grammi, del residuo della prima estrazione (parte aliquota dell'estratto)

b = massa, in grammi, del residuo della seconda estrazione.

8.2. La quantità di sostanza sottoposta all'analisi nel caso di prodotti poveri di materie grasse può essere portata a 5 g.

⁽¹⁾ Sostituire i frammenti di pietra pomice con alcune palline di vetro, quando si debbono eseguire ulteriori esami qualitativi sulla sostanza grassa.

ALLEGATO II

5. DOSAGGIO DELLA VIRGINIAMICINA

— per diffusione in agar —

1. Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo permette di dosare la virginiamicina nei mangimi e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di 2 mg/kg (2 ppm)⁽¹⁾.

2. Principio

Il campione viene estratto con una soluzione metanolica di Tween 80. L'estratto viene decantato o centrifugato, poi diluito. La sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione della virginiamicina su terreno agarizzato, insemato con *Micrococcus luteus*. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microrganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico nel campo delle concentrazioni utilizzate.

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

3.1. Conservazione del ceppo

Insemare con *Micrococcus luteus* il terreno colturale (4.1) distribuito in provette a becco di clarino. Incubare per 24 ore a 30 °C, conservare in frigorifero a 4 °C circa e trapiantare ogni 15 giorni.

3.2. Preparazione della sospensione batterica (a)

Mediante 2-3 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3), raccogliere la patina di una agar-coltura (3.1) preparata di recente. Con tale sospensione, insemare una bottiglia di Roux contenente 250 ml del terreno di coltura (4.1); incubare per 18-20 ore a 30 °C. Raccogliere i germi con 25 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3) e omogeneizzare. Diluire a 1/10 la sospensione mediante la soluzione di cloruro di sodio (4.3). La trasmittanza della sospensione, misurata a 650 nm sotto lo spessore di 1 cm in confronto con la soluzione di cloruro di sodio (4.3), deve essere del 75 % circa. Questa sospensione può essere conservata per una settimana alla temperatura di 4 °C circa.

4. Terreni colturali e reattivi

4.1. Terreno di mantenimento del ceppo e di base del dosaggio (b)

Peptone di carne	6,0 g
Triptone	4,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Acqua	1 000 ml
pH 6,5 (dopo sterilizzazione).	

4.2. Tampone al fosfato, pH 6

Fosfato bipoassico, K_2HPO_4	2,0 g
Fosfato monopotassico, KH_2PO_4	8,0 g
Acqua q.b. a	1 000 ml

4.3. Soluzione allo 0,8 % (p/v) di cloruro di sodio : sciogliere in acqua 8 g di cloruro di sodio, diluire a 1 000 ml e sterilizzare.

4.4. Metanolo.

4.5. Miscela di tampone al fosfato (4.2) e di metanolo (4.4) : 80/20 (v/v).

4.6. Soluzione metanolica allo 0,5 % (p/v) di Tween 80 : sciogliere 5 g di Tween 80 in metanolo (4.4) e diluire a 1 000 ml con metanolo.

4.7. Sostanza di riferimento : virginiamicina ad attività nota.

⁽¹⁾ 1 mg di virginiamicina equivale a 1 000 unità "UK".

(a) Possono essere impiegati altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano sospensioni di batteri analoghe.

(b) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio che dia gli stessi risultati.

5. Soluzioni di riferimento

Sciogliere nel metanolo (4.4) una quantità esattamente pesata della sostanza di riferimento (4.7); diluire con metanolo (4.4) in modo da ottenere una soluzione madre contenente 1 000 µg di virginiamicina/ml. Se conservata a 4 °C in bottiglia chiusa, questa soluzione è stabile per cinque giorni.

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive con la miscela (4.5) le seguenti soluzioni:

S ₃	1	µg/ml
S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml

6. Preparazione dell'estratto e delle soluzioni

6.1. Estrazione

6.1.1. Prodotti con tenore in virginiamicina non superiore a 100 mg/kg

Pesare una quantità di 50,0 g di campione. Aggiungere 200 ml della soluzione (4.6), agitare per 30 minuti, poi lasciar depositare o centrifugare. Prelevare 20 ml del supernatante ed evaporare a 5 ml in evaporatore rotante, a temperatura non superiore a 40 °C. Diluire il residuo con la miscela (4.5), fino ad ottenere una concentrazione presunta in virginiamicina pari a 1 µg/ml (= U₃).

6.1.2. Prodotti il cui tenore in virginiamicina è superiore a 100 mg/kg

Pesare una quantità di campione non superiore a 10,0 g e contenente da 1 a 50 mg di virginiamicina. Aggiungere 100 ml della soluzione (4.6), agitare per 30 minuti, poi lasciar depositare o centrifugare. Diluire il supernatante con la miscela (4.5) fino ad ottenere una concentrazione in virginiamicina pari a 1 µg/ml (= U₃).

6.2. Soluzioni dell'estratto

A partire dalla soluzione U₃, preparare per diluizioni successive (1 : 1) con la miscela (4.5) le soluzioni U₄ (concentrazione presunta : 0,5 µg/ml), U₂ (concentrazione presunta : 0,25 µg/ml) ed U₁ (concentrazione presunta : 0,125 µg/ml).

7. Modalità di dosaggio

7.1. Inoculazione del terreno di coltura

Con la sospensione di batteri (3.2), insembrare il terreno base per il dosaggio (4.1) alla temperatura di 50 °C circa. Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.1), determinare la quantità di sospensione di batteri che consente di ottenere, per le diverse concentrazioni di virginiamicina, aloni di inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora netti.

7.2. Preparazione delle piastre

La diffusione in agar si effettua su piastre con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S₃, S₄, S₂, S₁) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U₃, U₄, U₂, U₁). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni della sostanza di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che si possano praticare nel terreno agarizzato almeno otto pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti tra loro meno di 30 mm. Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm.

Versare nelle piastre una quantità di terreno (4.1) insembrato come indicato al punto 7.1, che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 2 mm circa (60 ml per una piastra di 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporre i volumi esattamente misurati delle soluzioni della sostanza di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro). Le operazioni descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

7.3. Incubazione

Incubare le piastre per 16-18 ore, alla temperatura di 30 °C ± 2 °C.

8. Valutazione

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto, procedendo ad esempio come segue.

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula :

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

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula :

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

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori S_1, S_2, S_4 e S_8 con quelli di U_1, U_2, U_4 e U_8 .

Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL e UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze, le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché $(SH - SL)$ e $(UH - UL)$ non differiscono fra loro di più del 10 % della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia U_1 e S_1 , sia U_8 e S_8 . In questo caso, i valori SL, SH, UL e UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti :

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

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

e mediante formule analoghe per UL e UH. Se si utilizza quest'alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log. A) con una delle formule seguenti :

Per 4 punti

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

Per 3 punti

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

o

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

Attività dell'estratto del campione = attività dello standard corrispondente $\times A$:

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

Se l'attività relativa si trova al di fuori della gamma di valori compresi fra 0,5 e 2,0, ripetere la determinazione procedendo ad opportune regolazioni delle concentrazioni dell'estratto o, eventualmente, delle soluzioni di riferimento. Quando tale attività non può essere ricondotta nella gamma di valori richiesta, il risultato deve essere considerato approssimativo e tale indicazione deve figurare sul certificato di analisi.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione. Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, la determinazione deve essere considerata insoddisfacente.

Esprimere il risultato in mg virginiamicina/kg alimento.

9. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non deve eccedere :

- 2 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti in virginiamicina inferiori a 10 mg/kg ;
- 20 % del risultato più elevato per i contenuti da 10 a 25 mg/kg ;
- 5 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti da 25 a 50 mg/kg ;
- 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 mg/kg ».

ALLEGATO III

1. DOSAGGIO DELLA ZINCO-BACITRACINA

— per diffusione in agar —

1. Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo permette di dosare la zinco-bacitracina nei mangimi e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di 5 mg/kg (5 ppm)⁽¹⁾.

2. Principio

Il campione viene estratto a pH 2 con una miscela metanolo-acqua-acido cloridrico e una soluzione di solfuro di sodio. Il solfuro di sodio permette di precipitare i sali di rame solubili che potrebbero interferire nella determinazione. L'estratto, portato a pH 6,5, viene concentrato (se necessario) e diluito. La sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione della zinco-bacitracina su terreno agarizzato, insemato con *Micrococcus luteus (flavus)*. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microrganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico nel campo delle concentrazioni utilizzate.

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

3.1. Conservazione del ceppo

Insemare con *Micrococcus luteus (flavus)* il terreno colturale (4.1) distribuito in provette a becco di clarino. Incubare per 24 ore a 30 °C, conservare in frigorifero a 4 °C circa e trapiantare ogni 15 giorni.

3.2. Preparazione della sospensione batterica (a)

Mediante 2-3 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3), raccogliere la patina di una agar-coltura (3.1) preparata di recente. Con tale sospensione, insemare una bottiglia di Roux contenente 250 ml del terreno di coltura (4.1); incubare per 18-20 ore a 30 °C. Raccogliere i germi con 25 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3) e omogeneizzare.

Diluire a 1/10 la sospensione mediante la soluzione di cloruro di sodio (4.3). La trasmittanza della sospensione, misurata a 650 nm sotto lo spessore di 1 cm in confronto con la soluzione di cloruro di sodio (4.3), deve essere del 75 % circa. Questa sospensione può essere conservata per una settimana alla temperatura di 4 °C circa.

4. Terreni colturali e reattivi

4.1. Terreno di mantenimento del ceppo (b)

Peptone di carne	6,0 g
Tryptone	4,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Acqua	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (dopo sterilizzazione).	

4.2. Terreno di base del dosaggio (b)

Tryptone	10,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Tween 80	1 ml
Acqua	1 000 ml
pH 6,5 (dopo sterilizzazione).	

4.3. Soluzione allo 0,8 % (p/v) di cloruro di sodio: sciogliere in acqua 8 g di cloruro di sodio, diluire a 1 000 ml e sterilizzare.

4.4. Miscela metanolo/acqua/acido cloridrico (4.6): 80/17,5/2,5 (v/v/v).

⁽¹⁾ 1 mg di zinco-bacitracina (qualità per mangimistica) equivale a 42 unità internazionali (UI).

(a) Possono essere impiegati altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano sospensioni di batteri analoghe.

(b) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio che dia gli stessi risultati.

- 4.5. *Tampone al fosfato, pH 6,5*,
 Fosfato bipotassico, K_2HPO_4 22,15 g
 Fosfato monopotassico, KH_2PO_4 27,85 g
 Acqua q.b. a 1 000 ml
- 4.6. Acido cloridrico, d: 1,18-1,19
- 4.7. Acido cloridrico, 0,1 M
- 4.8. Soluzione, 1 M di idrossido di sodio
- 4.9. Soluzione 0,5 M circa di solfuro di sodio
- 4.10. Soluzione allo 0,04 (p/v) di bromocresolporpora :
 sciogliere 0,1 g di bromocresolporpora in 18,5 ml di soluzione 0,01 M di idrossido di sodio.
 Portare a 250 ml con acqua ed omogeneizzare.
- 4.11. Sostanza di riferimento : zinco-bacitracina di attività nota (espressa in UI).

5. Soluzioni di riferimento

Pesare una quantità di sostanza di riferimento (4.11) corrispondente a 1 050 UI (secondo il titolo indicato). Aggiungere 5 ml di acido cloridrico 0,1 M (4.7) e lasciar riposare 15 minuti. Aggiungere 30 ml di acqua, aggiustare il pH a 4,5 con il tampone fosfato (4.5) (impiegare 4 ml circa), portare a 50 ml con acqua ed omogeneizzare (1 ml = 21 UI).

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive (1 : 1) con il tampone al fosfato (4.5) le seguenti soluzioni :

S_3	0,42	UI/ml
S_4	0,21	UI/ml
S_2	0,105	UI/ml
S_1	0,0525	UI/ml

6. Preparazione dell'estratto

6.1. Estrazione

6.1.1. Premiscele ed alimenti minerali

Pesare una quantità di campione compresa tra 2,0 e 5,0 g, aggiungere 29,0 ml della miscela (4.4) ed 1,0 ml della soluzione di solfuro di sodio (4.9); agitare brevemente. Verificare che il pH sia uguale a 2 circa.

Agitare per 10 minuti, aggiungere 30 ml di tampone fosfato (4.5), agitare per 15 minuti e centrifugare. Prelevare un'aliquota della soluzione surnatante e portare il pH a 6,5 mediante la soluzione 1 M di idrossido di sodio (4.8), impiegando un pHmetro ovvero la soluzione di bromocresolporpora (4.10) come indicatore.

Diluire con il tampone fosfato (4.5), fino ad ottenere una concentrazione presunta di zinco-bacitracina pari a 0,42 UI/ml (= U_3).

6.1.2. Concentrati proteici

Pesare una quantità di campione di 10,0 g; aggiungere 49,0 g della miscela (4.4) ed 1,0 ml della soluzione di solfuro di sodio (4.9). Agitare brevemente. Verificare che il pH sia di 2 circa. Agitare per 10 minuti, aggiungere 50 ml del tampone fosfato (4.5), agitare per 15 minuti e centrifugare. Prelevare un'aliquota del surnatante e portare a pH 6,5 con la soluzione 1 M di idrossido di sodio (4.8), impiegando un pHmetro o la soluzione di bromocresolporpora (4.10) come indicatore.

Evaporare la metà circa del volume in evaporatore rotante a temperatura non superiore a 35 °C. Diluire con il tampone fosfato (4.5), fino ad ottenere una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 0,42 UI/ml (= U_3).

6.1.3. Altri alimenti

Pesare una quantità di 10,0 g di campione (20,0 g per una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 5 mg/kg). Aggiungere 24,0 ml della miscela (4.4) e 1,0 ml della soluzione di solfuro di sodio (4.9); omogeneizzare per 10 minuti. Aggiungere 25 ml di tampone fosfato (4.5), agitare per 15 minuti e centrifugare. Prelevare 20 ml del surnatante e regolare a pH 6,5 mediante la soluzione 1 M di idrossido di sodio (4.8), impiegando un pHmetro o la soluzione di bromocresolporpora (4.10) come indicatore.

Evaporare fino a 4 ml circa in evaporatore rotante a temperatura non superiore a 35 °C. Diluire il residuo con il tampone fosfato (4.5), fino ad ottenere una concentrazione presunta in zinco-bacitracina pari a 0,42 UI/ml (= U_3).

6.2. Soluzioni dell'estratto

Partendo dalla soluzione U_3 e per diluizioni successive (1 : 1) con il tampone fosfato (4.5) preparare le soluzioni U_4 (concentrazione presunta : 0,21 UI/ml), U_2 (concentrazione presunta : 0,105 UI/ml) ed U_1 (concentrazione presunta : 0,0525 UI/ml).

7. Modalità di dosaggio

7.1. Inoculazione del terreno di coltura

Con la sospensione di batteri (3.2), inseminare il terreno base per il dosaggio (4.2) alla temperatura di 50 °C circa. Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.2), determinare la quantità di sospensione di batteri che consente di ottenere, per le diverse concentrazioni di zinco-bacitracina, aloni di inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora netti.

7.2. Preparazione delle piastre

La diffusione in agar si effettua su piastre con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni della sostanza di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che si possano praticare nel terreno agarizzato almeno otto pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti tra loro meno di 30 mm. Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm.

Versare nelle piastre una quantità di terreno (4.2) inseminato come indicato al punto 7.1, che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 2 mm circa (60 ml per una piastra di 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporvi dei volumi esattamente misurati delle soluzioni della sostanza di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro). Le operazioni, descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

7.3. Incubazione

Incubare le piastre per 16-18 ore, alla temperatura di 30 °C \pm 2 °C.

8. Valutazione

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto, procedendo ad esempio come segue.

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula:

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

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula:

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

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori S_1, S_2, S_4 e S_8 con quelli di U_1, U_2, U_4 e U_8 .

Riportare i valori di SL e SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL e UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze, le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché (SH — SL) e (UH — UL) non differiscono fra loro di più del 10 % della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia U_1 e S_1 , sia U_8 e S_8 . In questo caso, i valori SL, SH, UL e UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti:

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

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

e mediante formule analoghe per UL e UH. Se si utilizza quest'alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log. A) con una delle formule seguenti :

Per 4 punti

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

Per 3 punti

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

o

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

Attività dell'estratto del campione = attività dello standard corrispondente $\times A$:

$$(U_s = S_s \times A)$$

Se l'attività relativa si trova al di fuori della gamma di valori compresi fra 0,5 e 2,0, ripetere la determinazione procedendo ad opportune regolazioni delle concentrazioni dell'estratto o, eventualmente, delle soluzioni di riferimento. Quando tale attività non può essere ricondotta nella gamma di valori richiesta, il risultato deve essere considerato approssimativo e tale indicazione deve figurare sul certificato di analisi.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione. Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, la determinazione deve essere considerata insoddisfacente.

9. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non deve eccedere :

- 2 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti in zinco-bacitracina inferiori a 10 mg/kg ;
 - 20 % del risultato più elevato per i contenuti da 10 a 25 mg/kg ;
 - 5 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti da 25 a 50 mg/kg ;
 - 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 mg/kg .
-