

31981L0715

10.9.1981

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

L 257/38

**ID-DISA' DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI
tal-31 ta' Lulju 1981**

li tistabbilixxi metodi Komunitarji ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' affarijiet ta' l-ikel għall-annimali

(81/715/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

ADDOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jstabbilixxi l-Komunità Ekonomika Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni ta' metodi Komunitarji biex jittiehdu l-kampjuni u għall-analiżi tal-kontroll uffiċjali ta' affarijiet ta' l-ikel għall-annimali ⁽¹⁾, kif l-aħħar emendata mill-Att ta' l-Adeżjoni tal-Greċja, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tagħha,

Billi dik id-Direttiva tehtieg li l-kontroll uffiċjali ta' l-affarijiet ta' l-ikel għall-annimali bl-iskop tal-kontroll ta' konformità mal-htigiet taht id-dispożizzjonijiet stabbiliti bil-liġi, b'regolament jew b'azzjoni amministrattiva li jikkoncernaw il-kwalità u l-kompożizzjoni ta' affarijiet ta' l-ikel għall-annimali jitwettaq bl-użu ta' metodi Komunitarji biex jittiehdu l-kampjuni u ta' analiżi;

Billi d-Direttivi tal-Kummissjoni 71/250/KEE ⁽²⁾, 71/393/KEE ⁽³⁾, 72/199/KEE ⁽⁴⁾, 73/46/KEE ⁽⁵⁾, 74/203/KEE ⁽⁶⁾, 75/84/KEE ⁽⁷⁾, 76/372/KEE ⁽⁸⁾ u 78/633/KEE ⁽⁹⁾, kif l-aħħar emendati bid-Direttiva tat-30 ta' Lulju 1981, diġà stabbilixxew numru ta' metodi Komunitarji ta' analiżi; billi l-progress tax-xogħol minn dak iż-żmien jagħmlu ideali li jiġi adottat id-disa' grupp ta' metodi;

Billi l-miżuri previsti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti għall-Affarijiet ta' l-Ikel għall-Annimali,

L-Artikolu 1

L-Istati Membri għandhom jehtiegu li l-analiżi għall-kontrolli uffiċjali ta' affarijiet ta' l-ikel għall-annimali, fir-rigward tal-kontenut tagħhom ta' avoparċina u sodju tal-monensin, jitwettaq skond il-metodi deskritti fl-Anness.

L-Artikolu 2

L-Istati Membri għandhom iġibu fis-seħh il-liġijiet, ir-regolamenti u d-dispożizzjonijiet amministrattivi neċessarji biex jikkonformaw ma' din id-Direttiva fl-1 ta' Diċembru 1981 u għandhom minnufih jinfirmaw lill-Kummissjoni bihom.

L-Artikolu 3

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fil-31 ta' Lulju 1981.

Għall-Kummissjoni

Gaston THORN

Il-President

⁽¹⁾ ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.

⁽²⁾ ĠU L 155, tat-12.7.1971, p. 13.

⁽³⁾ ĠU L 279, ta' l-20.12.1971, p. 7.

⁽⁴⁾ ĠU L 123, tad-29.5.1972, p. 6.

⁽⁵⁾ ĠU L 83, tat-30.3.1973, p. 21.

⁽⁶⁾ ĠU L 108, tat-22.4.1974, p. 7.

⁽⁷⁾ ĠU L 32, tal-5.2.1975, p. 26.

⁽⁸⁾ ĠU L 102, tal-15.4.1976, p. 8.

⁽⁹⁾ ĠU L 206, tad-29.7.1978, p. 43.

L-ANNESS

1. ID-DETERMINAZZJONI TA' L-AVOPARĊINA PERMEZZ TA' TIXRID F'MEDIUM TA' L-AGAR

1. L-ISKOP U L-QASAM TA' APPLIKAZZJONI

Il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' l-avoparċina fl-affarijiet ta' l-ikel għall-annimali u f' tahlitiet minn qabel. Il-limitu l-iktar baxx tad-determinazzjoni huwa 2mg/kg (2 ppm). Il-preżenza ta' antibijotiċi polietieri tista tinterferixxi fid-determinazzjoni.

2. IL-PRINĊIPJU

Il-kampjun hu estratt b'tahlita ta' l-aċetun/ta' l-ilma/ta' l-aċidu idrokloriku. L-attività antibijotika ta' l-estratt hi determinata billi jitkejjel it-tixrid ta' l-avoparċina f'*medium* ta' l-agar bil-*Bacillus subtilis*. It-tixrid jintwera permezz tal-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni tal-mikro-organizmu. Id-djametru ta' dawn iż-żoni jitqies bhala fi proporzjon dirett għall-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika tul il-firxa ta' konċentrazzjonijiet antibijotiċi impjegati.

3. IL-MIKRO-ORGANIŻMU: IL-BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Biex tinzamm il-kultura *principali*

Laqqam tubi li jikkontjenu inklinazzjonijiet ta' *medium* tal-kultura (4.1) bil-*Bacillus subtilis* u inkubahom tul il-lejl f'30 °C. Ahżen il-kultura fi frigg' f'madwar 4 °C. Erga laqqam kull xahar.

3.2. Il-preparazzjoni tas-sospensjoni ta' l-ispori ⁽¹⁾

Igbor il-patina minn inklinazzjoni ta' l-agar ippreparata riċentement (3.1) permezz ta' 2 ml sa 3 ml ta' ilma sterili. Uża din is-sospensjoni biex tlaqqam 300ml tal-*medium* tal-kultura (4.1) kontenut fi fjašketta Roux u inkuba għal bejn tlett ijiem sa hamsa f'30 °C. Igbor l-ispori fi 15 ml ta' etanol (4.2) wara kontroll ta' l-isporulazzjoni taht mikroskopju, u hallat sew. Din is-sospensjoni tista' tinzamm għal mill-inqas hames xhur f'madwar 4 °C.

4. IL-MEDJA TAL-KULTURA U R-RIAĠENTI

4.1. Il-*medium* tal-kultura ⁽²⁾

Peptun	6.0 g
Truptun	4.0 g
Estratt tal-hmira	3.0 g
Estratt tal-laham	1.5 g
Glukosju	1.0 g
Agar	15.0 g
Ilma	1 000 ml
pH 6.5 (wara l-isterilizzazzjoni)	

4.2. Etanol 20 % (v/v): žid 200 ml ta' l-etanol ma' 800 ml ilma.

4.3. Aċidu idrokloriku, d: 1.18 sa 1.19.

⁽¹⁾ Jistghu jintużaw metodi oħrajn sakemm ikun għe stabbilit li jagħtu sospensjonijiet simili ta' l-ispori.

⁽²⁾ Kull *medium* kummerċjali tal-kultura ta' kompożizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati jista' jintuża..

- 4.4. L-idrossidu tas-sodju, soluzzjoni 2 M.
- 4.5. Newtralizzant tal-fosfat, 0.1 M:
Il-fosfat tad-didroġenu tal-potassju, KH_2PO_4 : 13.6 g.
Ilma sa 1 000 ml.
Aġġusta l-pH sa 4.5.
- 4.6. Tahlita ta' aċetun/ilma/aċidu idrokloriku (4.3): 65/32.5/2.5 (v/v/v).
- 4.7. Sustanza standard: sulfat ta' l-avoparcina ta' attività maghrufa.

5. SOLUZZJONIJIET STANDARD

Holl kwantità peżata b'mod eżatt ta' bejn wiehed u ieħor 10 mg tas-sustanza standard(4.7) f'newtralizzant tal-fosfat (4.5) u žid ma' dan in-newtralizzant biex taġhti soluzzjoni prinċipali li tikkontjeni 100 µg avoparcina għal kull millilitru. Mahżuna fi fjasketta magħluqa f' 4 °C, din is-soluzzjoni hi stabbli għal sa sebat ijiem.

5.1. Għal tahlitiet minn qabel

Minn din is-soluzzjoni prinċipali ipprepara b'dilwizzjoni suċċessiva b'newtralizzant (4.5) is-soluzzjonijiet li ġejjin:

S_8	4.0 µg/ml
S_4	2.0 µg/ml
S_2	1.0 µg/ml
S_1	0.5 µg/ml

5.2. Għal affarijiet ta' l-ikel għall-animali

Mis-soluzzjoni prinċipali ipprepara b'dilwizzjoni suċċessiva bin-newtralizzant (4.5) is-soluzzjonijiet li ġejjin:

S_8	2.0 µg/ml
S_4	1.0 µg/ml
S_2	0.5 µg/ml
S_1	0.25 µg/ml

6. IL-PREPARAZZJONI TA' L-ESTRATT U TAS-SOLUZZJONIJIET TA' ANALIŻI

6.1. Tahlitiet minn qabel

Ippeża, sa l-egreb 10 mg, kampjun biżżejjed biex jikkontjeni 10 sa 100 mg avoparcina. Itrasferixxi għal fjasketta ggradwata ta' 100 ml b'60 ml tat-tahlita (4.6) u ħawwad għal 15-il minuta fuq *shaker* mekkaniku. Ikkontrolla l-pH u aġġusta sa pH 2, jekk neċessarju, bl-aċidu idrokloriku (4.3). Žid sal-volum bit-tahlita (4.6) u hallat sew. Iffiltra porzjon minn karta filtranti addattata (eż, *Whatman* Nru 1), billi tarmi l-ewwel 5 ml tal-filtrat. Hu alikwot u aġġusta l-pH sa 4.5 b'soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju (4.4). Iddilwixxi din is-soluzzjoni b'newtralizzant (4.5) biex tottjeni konċentrazzjoni mistennija ta' l-avoparcina ta' 4 µg/ml (= U_8).

Minn din is-soluzzjoni ipprepara soluzzjonijiet U_4 (kontenut mistenni: 2 µg/ml), U_2 (kontenut mistenni: 1 µg/ml) u U_1 (kontenut mistenni: 0.75 µg/ml) permezz ta' dilwizzjoni suċċessiva (1 + 1) b'newtralizzant (4.5).

6.2. Affarijiet għall-ikel għall-animali

Ippeża kwantità ta' kampjun ta' 50 g u hallat 100 ml tat-tahlita (4.6) għal 30 minuta fuq *shaker* mekkaniku. Iċċara l-estratt b'centrifugazzjoni (bl-użu ta' tubi magħluqa ċentrifugi), hu alikwot ta' l-estratt iċċarat (ara t-tabella hawn taht) u aġġusta l-pH għal 4.5 b'soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju (4.4). Iddilwixxi dan l-alikwot b'newtralizzant (4.5) biex tipprvodi U_8 (ara t-tabella hawn taht).

Minn din is-soluzzjoni ipprepara soluzzjonijiet U_4 (il-kontenut mistenni: 1 $\mu\text{g/ml}$), U_2 (il-kontenut mistenni: 0.5 $\mu\text{g/ml}$) u U_1 (il-kontenut mistenni: 0.25 $\mu\text{g/ml}$) permezz ta' dilwizzjoni suċċessiva (1 + 1) b'newtralizzant (4.5).

Il-livell presunt ta' avoparċina (mg/kg)	5	7.5	10	15	20	40
Il-piż ta' kampjun (g(+/- 0.1g))	50	50	50	50	50	50
Il-volum tat-taħlita (4.6 (ml))	100	100	100	100	100	100
Il-volum ta' l-estratt ikkjarifikat (ml)	20	15	20	15	20	10
Il-volum finali (ml): U_8	25	25	50	50	100	100
Il-koncentrazzjoni mistennija U_8 ($\mu\text{g/ml}$)	2	bejn wieħed u iehor 2	2	bejn wieħed u iehor 2	2	2

7. PROCĊEDURA TA' ANALIŻI

7.1. L-inokulazzjoni tal-medium ta' analiżi

Laqqam il-medium ta' analiżi (4.1) bis-sospensjoni ta' l-ispora (3.2) f'50 sa 60 °C. Permezz ta' provi preliminari fuq pjanci b'medium ta' analiżi (4.1) iddetermina l-kwantità tas-sospensjoni ta' l-ispora meħtieġa biex tagħti l-akbar u l-iktar żoni ċari ta' inibizzjoni bil-varji koncentrazzjonijiet ta' avoparċina.

7.2. Il-preparazzjoni tal-pjanci

It-tixrid permezz ta' l-agar hu mwettaq fi pjanci bl-erba' koncentrazzjonijiet tas-soluzzjoni (S_8, S_4, S_2, S_1) u bl-erba' koncentrazzjonijiet tas-soluzzjoni ta' l-analiżi (U_8, U_4, U_2, U_1). Dawn l-erba' koncentrazzjonijiet ta' l-estratt u *standard* għandhom neċessarjament jitqiegħdu f'kull pjanca. B'dan l-iskop, għażel pjanci kbar biżżejjed biex jippermettu mill-inqas tmien toqbiet b'dijametru ta' 10 sa 13-il mm u mhux inqas minn 30 mm bejn centri li għandhom isiru fil-medium ta' l-agar. It-test jista' jitwettaq fuq pjanci li jikkonsistu f'folja tal-ħġieg b'ċirku ta' superfiċi ta' l-aluminju jew tal-plastik imqiegħed fuq 200 mm f'dijametru u 20 mm għoli.

Ferra' fil-pjanci kwantità tal-medium (4), imlaqqam b'hal f'7.1, biex tagħti saff ohxon madwar 2 mm (60ml għal pjanca ta' 200 mm djametru). Hallih joqgħod f'pożizzjoni livell, taqqab it-toqob u qegħidhom f'volumi mkejla eżatti ta' analiżi u soluzzjonijiet standard (bejn 0.10 u 0.15 ml għal kull toqba, skond id-dijametru). Applika kull koncentrazzjoni mill-inqas erba darbiet sabiex kull determinazzjoni hi soġġetta għal evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

7.3. L-inkubazzjoni

Inkuba l-pjanci għal 16 sa 18-il siegħa fi 30 °C.

8. IL-VALUTAZZJONI

Kejjel id-djometru taż-żoni ta' inibizzjoni sa l-eqreb 0 71 mm. Irreġistra l-kejl medju għal kull koncentrazzjoni fuq karta grafika semi-logaritmika li turi l-logaritmu tal-koncentrazzjonijiet meta mqabbla mad-djometri taż-żoni ta' inibizzjoni. Immarka l-linji ta' "l-aħjar qagħda" ta' kemm is-soluzzjoni standard u kemm l-estratt, per eżempju b'hal hawn taht.

Iddetermina l-punt ta' "l-aħjar qagħda" għall-ogħla livell standard (SL) bl-użu tal-formula:

$$(a) \quad SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10}$$

Iddetermina l-punt ta' "l-ahjar qagħda" għall-ogħla livell standard (SH) bl-użu tal-formula:

$$b) \quad SH = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 + 2S_1}{10}$$

Bl-istess mod ikkalkula l-punti ta' "l-ahjar qagħda" għal-livell l-iktar baxx ta' l-estratt u l-livell l-iktar għoli ta' l-estratt billi tissostitwixxi U_1, U_2, U_3, U_4 u U_8 għal S_1, S_2, S_4 u S_8 fil-formula ta' hawn fuq.

Irreġistra l-valuri kkalkolati SL u SH fuq l-istess karta grafika u għaqqadhom biex tagħti l-linja ta' "l-ahjar qagħda" għas-soluzzjoni standard. Bl-istess mod, irreġistra l-UL u l-UH u għaqqadhom biex tagħtihom il-linja ta' "l-ahjar qagħda" għall-estratt.

Fl-assenza ta' linji ta' interferenza l-linji għandhom ikunu paralleli. Għal skopijiet prattiċi l-linji jistgħu jiġu kkunsidrati paralleli jekk il-valuri (SH-SL) u (UH-UL) ma jvarjawx b'iktar minn 10 % mill-valur medju tagħhom.

Jekk il-linji jinstab li mhumiex paralleli, jew l-U1 u s-S1 jew l-U8 u s-S8 jistgħu jitwarrbu u l-SL, l-SH, il-UL u l-UH ikkalkulati, bl-użu tal-formula alternattiva, biex jagħtu linji alternattivi ta' "l-ahjar qagħda":

$$a') \quad SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{v} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$b') \quad SH = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \quad \text{jew} \quad \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

u bl-istess mod għall-UL u l-UH. Il-linji alternattivi ta' "l-ahjar qagħda" għandhom jiġu kkontrollati għall-paralleliżmu bħal qabel. Il-fatt li r-riżultat ġie kkalkulat minn tliet livelli għandu jiġi nnutat fir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bħala li huma paralleli, ikkalkula l-logaritmu tal-log ta' l-attività relattiva. (log A) permezz ta' waħda mill-formuli li ġejjin:

Għal erba' livelli

$$c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Għal erba' livelli

$$d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

Għal tliet livelli

$$d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Attività reali = attività presupposta × attività relattiva.

Jekk l-attività relattiva jinstab li hi barra l-firxa ta' 0,75 sa 2,70, imbagħad irrepiti l-analiżi billi tagħmel aġġustamenti approprijati għall-koncentrazzjonijiet ta' l-estratt jew, jekk dan mhux possibbli, għas-soluzzjonijiet standard. Meta l-attività relattiva ma tistax tingħieb fil-firxa adegwata, kull riżultat ottenut għandu jiġi kkunsidrat bħala approprijat u dan għandu jiġi nnutat fir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bħala mhux paralleli, irrepiti d-determinazzjoni. Jekk il-paralleliżmu ikun għadu ma ntlahaqx, id-determinazzjoni għandha tiġi kkunsidrata bħala insodisfaċenti.

9. IR-RATA TA' REPETIZZJONI

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun, mill-istess analist, m'għandhiex teċċedi:

- 2 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' avoparcina minn 2 u sa 10 mg/kg,
- 20 % relata ma' l-ogħla valur għal kontenuti ta' 10 sa 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' 25 sa 50 mg/kg,
- 10 % relatati ma' l-ogħla valur għal kontenuti l fuq minn 50 mg/kg.

2. ID-DETERMINAZZJONI TA' SODJU TA' MONENSIN PERMEZZ TA' TIXRID F'MEDIUM TA' L-AGAR

1. L-ISKOP U L-QASAM TA' APPLIKAZZJONI

Il-metodu huwa għad-determinazzjoni tas-sodju ta' *monesin* f'affarijiet għall-ikel għall-annimali u tahlitiet minn qabel. Il-limitu ta' determinazzjoni 1 iktar baxx huwa 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. IL-PRINĊIPJU

Il-kampjun hu estratt b' 90 % metanol L-estratt hu sottomess għal proċeduri approprijati skond il-kontneut tas-sodju tal-*monesin* tal-kampjun. L-attività antibijotika hi ddeterminata billi jitkejjel it-tixrid tas-sodju tal-*monesin f medium* ta' l-*agar* inokulat bil-*Bacillus subtilis*. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni għandu jġi meqjus bi proporzjon dirett għall-logaritmu tal-koncentrazzjoni antibijotika tul il-firxa tal-koncentrazzjonijiet antibijotiċi impjegati. Is-sistema ta' din is-sistema ta' analiżi hi mnaqqsa fil-preżenza ta' jonji tas-sodju.

3. MIKRO-ORGANIŻMU: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Biex tinżamm il-kultura prinċipali

Laqqam it-tubi li jikkontjenu inklinazzjonijiet tal-*medium* ta' l-*agar* (4.1) bil-*Bacillus subtilis* u inkubahom tul il-lejl fi 30 °C. Aħżen il-kultura fi frigġ f'madwar 4 °C. Erġa laqqam kull xahar.

3.2. Il-preparazzjoni tas-sospensjoni ta' l-ispori ⁽²⁾

Igħbor il-patina minn inklinazzjoni ta' l-*agar* ippreparata riċentement (3.1) permezz ta' 2 sa 3 ml ta' ilma sterili. Uża din is-sospensjoni biex tlaqqam 300 ml ta' *medium* tal-kultura (4.1) kontenut fi fjasketta Roux u inkuba għal tlieta sa hamest ijiem fi 30 °C. Igħbor l-ispori fi 15-il ml ta' 20 % ta' etanol (4.3), wara kontroll ta' l-isporulazzjoni taht il-mikroskopju u hallat sewwa. Din is-sospensjoni għandha tinżamm għal mill-inqas hames xhur f'madwar 4 °C

4. IL-MEDJA TAL-KULTURA U R-RIAĠENTI

4.1. Il-*medium* tal-kultura ⁽³⁾

Triptun	10.0 g
Estratt tal-ħmira	3.0 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Glukosju	1.0 g
Agar (skond il-kwalità)	10.0 sa 20.0 g
Ilma	1 000 ml

pH 6.5 (wara l-isterilizzazzjoni).

4.2. Il-*medium* ta' l-analiżi

Glukosju	10.0 g
Estratt tal-ħmira	2.5 g
Fosfat tad-dipotassju ta' l-idroġenu, K ₂ HPO ₄	0.69 g
Fosfat tad-dipotassju ta' l-idroġenu, KH ₂ PO ₄	0.45 g
Agar (skond il-kwalità)	10.0 sa 20.0 g
Ilma	1 000 ml

pH 6 (wara l-isterilizzazzjoni).

⁽¹⁾ 1 mg tas-sodju tal-monensin hija ekwivalenti għal 1 000 UK unità.

⁽²⁾ Jistgħu jintużaw metodi oħrajn sakemm ikun għie stabbilit li jagħtu sospensjonijiet simili ta' l-ispori.

⁽³⁾ Kull medium kummerċjali tal-kultura ta' komposizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati jista' jintuża.

- 4.3. Etanol 20 % (v/v): žid 200 ml ta' l-etanol ma' 800 ml ilma.
- 4.4. Metanol, anidridu.
- 4.5. Metanol 90 % (v/v): žid 900 ml ta' metanol (4.4) ma' 100 ml ilma.
- 4.6. Metanol 50 % (v/v): žid 500 ml tal-metanol (4.4) ma' 500 ml ilma.
- 4.7. Ossidu ta' l-aluminju, ggranulat (*alcoa F, 20 mesh alumina attivata UG 1: F. Lancaster and Co., jew ekwivalenti*).
- 4.8. Sustanzi standard: sodju tal-*monensin* ta' attività magħrufa (eż. mil-Laboratorju Internazzjonali għal Standards Bijoloġiċi.. Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK- Surrey KT 15 3NB).

5. L-APPARAT

- 5.1. Evaporatur dawwari ta' vakwu, bi fjasketta biż-żaqq tond ta' 250 ml.
- 5.2. Tubu tal-ħġieg għall-kromatografija, djametru intern 25 mm, tul: 400 mm, b'tarf miftuħ ta' 2 mm dijametru.
- 5.3. Tubu tal-ħġieg għall-kromatografija, djametru intern: 11-il mm, tul: bejn wieħed u ieħor 300 mm, b'tarf miftuħ ta' 2 mm dijametru.

6. SOLUZZJONIJIET STANDARD

Holl kwantità peżata b'mod eżatt tas-sustanza standard (4.8) fil-metanol (4.4) u žid biex tagħti soluzzjoni prinċipali li tikkontjeni 800 µg. Mahżuna fi fjasketti magħluqa bit-tapp f'4 °C, din is-soluzzjoni hi stabbli għal sa ġimagħtejn.

Minn din is-soluzzjoni prinċipali ipprepara b'dilwizzjoni suċċessiva b'50 % metanol (4.6) is-soluzzjonijiet li ġejjin:

- S₈ 8.0 µg/ml
- S₄ 4.0 µg/ml
- S₂ 2.0 µg/ml
- S₁ 1.0 µg/ml

7. IL-PREPARAZZJONI TA' L-ESTRATT

7.1. L-estrazzjoni

7.1.1. It-tahlitiet minn qabel

Iżen kwantità ta' kampjun ta' 2 gm, žid 100 ml ta' 90 % metanol (4.5), omoġenizza u ċċentrifuga għal f'it minuti. Iddilwixxi s-soluzzjoni supernatanti ma' 50 % metanol (4.6) biex tottjeni kontenut tas-sodju *monensin* mistenni ta' 8 µg/ml (= U₈).

7.1.2. Affarijiet ta' l-ikel għall-animali b'livell ta' sodju *monensin* mhux iktar baxx minn 50 ppm

Ipeża kwantità ta' kampjun ta' 10 sa 20 g, žid 100 ml ta' 90 % metanol (4.5), omoġenizza għal 15-il minuta u ħalliha toqghod.

Inserixxi għeluq tat-tajjar fit-tarf dejjaq ta' tubu tal-ħġieg (5.2) u žid l-ossidu ta' l-aluminju (4.7) b'daqqiet ħfief sakemm il-kolonna tilhaq 75 sa 80 mm għoli.

Ferra' l-estratt għal fuq il-kolonna ta' l-ossidu ta' l-aluminju u iġbor il-filtrat. Žid 30 ml tal-filtrat ma 50 ml ilma. Aghmel diluwizzjonijiet sussegwenti ma' 50 % metanol (4.6) biex tottjeni kontenut mistenni ta' sodju tal-*monensin* 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3. *Affarijiet ta' l-ikel għall-animalli b'livell tas-sodju tal-monensin iktar baxx minn 50 ppm (sa limitu ta' 10 ppm)*

Ippeża kwantità ta' kampjun ta' 10 sa 20 g, žid 100 ml ta' 90 % metanol (4.5) u omogenizza għal 15-il minuta. Iċċentrifuga sakemm ċar.

Għal kampjun li jikkontjeni 20 ppm ta' sodju tal-*monensin*, hu 40 ml tal-likwidu supernatanti. Għal kampjun li jikkontjeni 10 ppm, hu 80 ml u evapora san-nixfa taht vakwu fuq evaporatur dawwari (5.1) u mhux iktar minn 40 °C. Holl ir-residwu f'10 ml ta' 90 % metanol (4.5).

Inserixxi għeluq tat-tajjar fit-tarf dejjaq tat-tubu tal-ħġieġ (5.3) u žid ossidu ta' l-aluminju (4.7) b'daqgiet ħfief sakemm il-kolonna tilhaq 75 sa 80 mm għoli.

Ferra s-soluzzjoni metanolika tar-residwu għal fuq il-kolonna ta' l-ossidu ta' l-aluminju u iġbor il-filtrat. Aħsel il-kolonna b' 10 ml ta' 90 % metanol (4.5) u kkombina l-hasliet mal-filtrat.

Evapora s-soluzzjoni għal nixfa taht vakwu fuq evaporatur dawwari (5.1) b'inqas minn 40 °C. Holl ir-residwu f'10 ml ta' metanol anidruż (4.4) u žid sa 20 ml bl-ilma. Iċċentrifuga s-soluzzjoni f'mill-inqas 4 000 r/min għal mill-inqas ħames minuti. Aghmel dilwizzjonijiet sussegwenti b' 50 % metanol (4.6) biex tottjeni kontenut ta' sodu ta' *monensin* ta' 8 µg/ml (= U₈).

7.2. **Soluzzjonijiet ta' analiżi**

Mis-soluzzjoni U8 ipprepara soluzzjonijiet U4 (kontenut mistenni: 4 µg/ml), U2 (kontenut mistenni: 2 µg/ml) u U1 (kontenut mistenni: 1 µg/ml) permezz ta' dilwizzjoni suċċessiva (1 + 1) b'50 % metanol (4.6).

8. **PROCĊEDURA TA' ANALIŻI**

8.1. **It-tilqim tal-medium ta' analiżi**

Laqqam il-*medium* ta' analiżi (4.2) bis-sospensjoni ta' l-ispora (3.2) f'50 sa 60 °C. Permezz ta' provi preliminari fuq pjanċi b'*medium* ta' analiżi (4.2) iddetermina l-kwantità tas-sospensjoni ta' l-ispora mehtieġa biex tagħtihom l-akbar żoni u dawk l-iktar ċari ta' inibizzjoni bil-varji konċentrazzjonijiet ta' sodju ta' *monensin*.

8.2. **Il-preparazzjoni tal-pjanċi**

It-tixrid permezz ta' *agar* jitwettaq fi pjanċi bl-erba' konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (S₈, S₄, S₂, S₁) u bl-erba' konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni ta' analiżi (U₈, U₄, U₂, U₁). Dawn l-erba' konċentrazzjonijiet ta' estratt u standard għandhom neċessarjament jitqiegħdu f'kull pjanċa. Għal dan l-iskop, aghzel pjanċi kbar biżżejjed biex jippermettu mill-inqas tmien toqbiet b'dijametru ta' 10 sa 13-il mm u mhux inqas minn 30 mm bejn iċ-ċentri li għandhom isiru fil-*medium* ta' l-*agar*. It-test jista' jitwettaq fuq pjanċi li jikkonsistu f'folja tal-ħġieġ b'ċirku ta' superfiċi ta' l-aluminju jew tal-plastik imqiegħed fuq, 200 mm fi djametru u 20 mm għoli.

Ferra' fil-pjanċi kwantità tal-*medium* (4.2), imlaqqma bħal f'8.1, biex tagħti saff madwar 2 mm ohxon (60 ml għal pjanċa ta' djametru ta' 200 mm) Halliha toqghod f'pożizzjoni livell, taqqab it-toqob u qiegħed fihom volumi mkejla eżatt ta' soluzzjonijiet ta' analiżi u standard (bejn 0.710 u 0.715 ml għal kull toqba, skond id-dijametru). Applika kull konċentrazzjoni mill-inqas erba' darbiet sabiex kull determinazzjoni hi soġġetta għal evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

8.3. **L-inkubazzjoni**

Inkuba l-pjanċi għal bejn wiehed u iehor 18-il siegħa f'35 sa 37 °C.

9. **IL- VALUTAZZJONI**

Kejjel id-djametru taż-żoni ta' inibizzjoni sa l-eqreb 0.1 mm. Irreġistra l-kejl medju għal kull konċentrazzjoni fuq karta grafika semilogaritimika li turi l-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet f' relazzjoni mad-djometri taż-żoni ta' inibizzjoni. Pinġi l-linji ta' "l-aħjar qagħda" ta' kemm is-soluzzjoni standard u l-estratt, per eżempju bħal taht.

Iddetermina l-punt ta' "l-ahjar qaghda" ghal-livell standard l-iktar baxx (SL) bl-użu tal-formula:

$$a) \text{ SL} = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10}$$

Iddetermina l-punt ta' "l-ahjar qaghda" ghal-livell standard l-iktar gholi (SH) bl-użu tal-formula:

$$b) \text{ SH} = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 + 2S_1}{10}$$

Bl-istess mod, ikkalkula l-punti ta' "l-ahjar qaghda" ghal-livell ta' l-estratt l-iktar baxx (UL) u l-livell l-iktar gholi ta' l-estratt (UH) billi tissostitwixxi U_1, U_2, U_4 u U_8 ghal S_1, S_2, S_4 u S_8 fil-formuli ta' hawn fuq.

Irreġistra l-valuri kkalkolati SL u SH fuq listess karta grafika u ghaqqadhom biex taghti l-linja ta' "l-ahjar qaghda" ghas-soluzzjoni standard. Bl-istess mod, irreġistra UL u UH u ghaqqadhom biex taghti l-linja ta' "l-ahjar qaghda" għall-estratt.

Fl-assenza ta' xi interferenza l-linji għandhom ikunu paralleli. Għal skopijiet prattiċi l-linji jistgħu jiġu kkunsidrati paralleli jekk il-valuri (SH-SL) u (UH-UL) ma jvarjawx b'iktar minn 10 % mill-valur medju tagħhom

Jekk il-linji jinstab li mhumiex paralleli, jew l-U1 u s-S1 jew l-U8 u s-S8 jistgħu jitwarribu u s-SL, s-SH, l-UL u l-UH ikkalkulati, bl-użu tal-formuli alternattivi, biex jagħtu l-linji alternattivi ta' "l-ahjar qaghda":

$$a) \text{ SL} = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{jew} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$a) \text{ SL} = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{jew} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

u bl-istess mod għal UL u UH. Il-linji alternattivi ta' "l-ahjar qaghda" għandhom jiġu kkontrollati għal paralellizmu qabel. Il-fatt li r-riżultat ġie kkalkolat minn tliet livelli għandu jiġi nnutat fir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bhala paralleli, ikkalkula l-logaritmu tal-log relattiv ta' attività.

(log. A) permezz ta' wahda mill-formuli li ġejjin:

$$c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Għal tliet livelli

$$d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

jew

$$d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

L-attività reali = l-attività mistennija \times l-attività relattiva.

Jekk l-attività relattiva tinstab barra l-firxa ta' 0·5 sa 2·0, imbagħad irrepiti l-analiżi b'aġġustamenti approprijati għall-koncentrazzjonijiet ta' l-estratt jew, jekk dan mhumiex possibbli, għas-soluzzjoni standard. Meta l-attività relattiva ma tistax tingjib fil-firxa meħtieġa, kull riżultat ottenut għandu jiġi kkunsidrat bhala approssimat u dan għandu jiġi nnutat fir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bhala li mhumiex paralleli, irrepiti d-determinazzjoni. Jekk il-paraellizmu xorta ma jintlaħaq, id-determinazzjoni għandha tiġi kkunsidrata bhala insodisfaċenti.

10. IR-RATA TA' REPETIZZJONI

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun, mill-istess analist, m'għandhiex tinqabeż:

- 20 % relatat ma' l-oghla valur għal kontenuti ta' sodju *monensin* minn 10 sa 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' 25 sa 50 mg/kg,
- 10 % relatat ma' l-oghla valur għal kontenuti l fuq minn 50 mg/kg.