

31991D0180

13.4.1991

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

L 93/1

ID-DEĊIŻJONI TAL-KUMMISSJONI

ta' l-14 ta' Frar 1991

li tistabbilixxi ċerti metodi ta' analiżi u kontroll ta' ħalib mhux ipproċessat u ħalib trattat bis-shana

(91/180/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

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

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 85/397/KEE tal-5 ta' Awwissu 1985 dwar is-saħħa u l-problemi tas-saħħa ta' l-annimali li jaffettwaw il-kummerċ intra-Komunitarju f'ħalib trattat bis-shana ⁽¹⁾, kif l-aħħar emendata bid-Direttiva 89/662/KEE ⁽²⁾, u b'mod partikolari l-Artikolu 10(2) tagħha,

Billi l-Artikolu 10(2) jipprovdi li l-Kummissjoni għandha tistabbilixxi metodi ta' analiżi u kontroll li għandhom jiġu użati biex jagħmlu monitoraġġ ta' konformità ma' standards li għandhom x'jaqsmu ma' ħalib mhux ipproċessat u ħalib trattat bis-shana;

Billi huwa neċessarju, għal ħalib mhux ipproċessat, li jiġu stabbiliti metodi b'mod partikolari biex jiddeterminaw il-kont tal-plates, il-kont taċ-ċelloli, il-punt tal-frizza u l-preżenza ta' antibijotiċi;

Billi huwa neċessarju, għal ħalib pasturizzat, li jiġu stabbiliti metodi b'mod partikolari biex tiġi determinata l-assenza ta' patogeniċi, in-numru ta' koliformi, il-kont tal-plates, l-assenza ta' fosfati, il-preżenza ta' perossidasju, l-assenza ta' anitbijotiċi u l-punt tal-frizza;

Billi huwa neċessarju, għal ħalib sterilizzat u ħalib ta' UHT (temperatura ultra għolja), li jiġu stabbiliti metodi inpartikolari biex jiġu determinati l-kont tal-plates u l-assenza ta' antibijotiċi;

Billi għal raġunijiet tekniċi, huwa opportun bhala l-ewwel pass li jiġu stabbiliti metodi ta' referenza ta' analiżi u ta' kontrolli biex tiġi asigurata konformità ma' ċerti standards; billi huwa neċessarju, b'mod partikolari li jibqgħu jiġu eżaminati l-kondizzjonijiet li taħthom metodi ta' rutina, analitiċi u ta' test għandhom jiġu applikati; billi, fl-istennija tar-riżultati ta' dan l-eżami, hija r-responsabbiltà ta' l-Istati Membri li jintużaw metodi rutina approprijati biex tiġi asigurata konformità ma' l-istandards stabbiliti fid-Direttiva 85/397/KEE;

Billi d-determinazzjoni ta' metodi ta' referenza ta' analiżi u kontroll tinkludi d-determinazzjoni tal-proċeduri analitiċi li għandhom jiġu esegwiti u l-mod ta' kif għandhom jiġu stabbiliti l-kriterji ta' preċiżjoni sabiex tiġi asigurata interpretazzjoni uniformi tar-riżultati;

Billi l-miżuri previsti f'din id-Deciżjoni huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Veterinarju Permanenti,

ADDOTTAT DIN ID-DEĊIŻJONI:

L-Artikolu 1

Il-proċeduri ta' referenza għall-analiżi u l-kontroll ta' ħalib mhux ipproċessat għandhom ikunu dawn li ġejjin:

- id-determinazzjoni tal-punt frizza,
- l-enumerazzjoni ta' mikro-organizzmi — it-test tal-kont tal-plates bi 30°C
- l-enumerazzjoni taċ-ċelloli somatiċi,
- is-sejba ta' antibijotiċi u sulfonamidi.

⁽¹⁾ ĠU L 226, ta' l-24.8.1985, p. 13.

⁽²⁾ ĠU L 395, tat-30.12.1989, p. 13.

L-Artikolu 2

Il-proċeduri ta' referenza għall-analiżi u l-kontroll ta' ħalib pasturizzat għandhom ikunu dawn li ġejjin:

- id-determinazzjoni tal-punt friża,
- id-determinazzjoni ta' l-attività tal-fosfati,
- id-determinazzjoni ta' l-attività perossida,
- l-enumerazzjoni ta' mikro-organismi — it-test tal-kont tal-plates bi 30 °C,
- l-enumerazzjoni ta' mikro-organismi — it-test tal-kont tal-plates b'21 °C,
- l-enumerazzjoni ta' koliformi — il-kont tal-kolonji bi 30 °C,
- is-sejba ta' antibijotiċi u sulfonamidi,
- is-sejba ta' mikro-organismi patoġeniċi,

L-Artikolu 3

Il-proċeduri ta' referenza għall-analiżi u l-kontroll ta' ħalib ta' UHT u ħalib sterilizzat għandhom ikunu dawn li ġejjin:

- l-enumerazzjoni ta' mikro-organismi
- it-test tal-kont tal-plates bi 30 °C,
- id-determinazzjoni tal-punt friża,
- is-sejba ta' antibijotiċi u sulfonamidi.

L-Artikolu 4

Il-proċeduri ta' referenza għall-analiżi u l-kontroll u l-kriterji ta' preċiżjoni li għandhom jiġu applikati għandhom jidhlu fis-sehħ u l-gbir ta' kampjuni għandu jiġi mwettaq skond ir-regoli stabbiliti fl-Anness 1.

L-Artikolu 5

Il-proċeduri ta' referenza għall-analiżi u l-kontroll imsemmija fl-Artikoli 1, 2 u 3 huma stabbiliti fl-Anness 2.

L-Artikolu 6

Din id-Deciżjoni għandha tiġi rieżaminata qabel il-31 ta' Diċembru 1992 sabiex tiehu kont ta' żviluppi fit-tagħrif xjentifiku u tekniku.

L-Artikolu 7

Din id-Deciżjoni hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fl-14 ta' Frar 1991.

Għall-Kummissjoni

Ray MAC SHARRY

Membri tal-Kummissjoni

L-ANNEX I

WERREJ

I. Dispożizzjonijiet ġenerali	187
II. Kampjuni ta' halib mhux ipproċessat u halib trattat bis-sħana.	189

I. DISPOŻIZZJONIJET ĠENERALI

1. **Introduzzjoni**

Huma deskritti dispożizzjonijiet ġenerali fejn għandhom x 'jaqsmu riġenti, tagħmir, l-espressjoni tar-riżultati, rapporti ta' preċiżjoni u ta' kontroll. L-awtoritajiet kompetenti ta' l-Istati Membri u l-laboratorji ta' applikazzjoni inkarigati biex jiehdu kampjuni u bil-kontroll tal-halib għandhom jirrispettaw id-dispożizzjonijiet ġenerali.

2. **Riġenti**

2.1. *Ilma*

2.1.1. Kull meta jissema' l-ilma għal skopijiet ta' soluzzjoni, diluzzjoni jew tlahlieh, l-ilma distillat, l-ilma dionizzat jew l-ilma dimineralizzat ta' mill-inqas purità ekwivalenti għandu jintuża sakemm mhux speċifikat mod ieħor. Għal skopijiet mikrobijoloġiċi għandu jkun hieles minn sustanzi li jistghu jaffettwaw jew jinfluwenzaw it-tkabbir ta' miko-organizmi taħt kondizzjonijiet ta' kontroll.

2.1.2. Kull meta ssir referenza għal "soluzzjoni" jew "diluzzjoni" mingħajr indikazzjoni oħra, tkun imfissra "soluzzjoni fl-ilma" jew "diluzzjoni bl-ilma".

2.2. *Kimiċi*

Il-Kimiċi kollha użati għandhom ikunu ta' kwalità analitika ta' riġenti rikonoxxuta sakemm mhux speċifikat mod ieħor.

3. **Tagħmir**

3.1. *Lista ta' tagħmir*

Il-listi ta' tagħmir mogħtija fil-proċeduri differenti ta' referenza jikkontjenu biss dawk l-oġġetti b' użu speċjalizzat u oġġetti għal speċifikazzjoni partikolari.

3.2. *Bilanċ analitiku*

Bilanċ analitiku jfisser bilanċ kapaċi biex jiżen b' 0,1 mg.

4. **Espressjoni tar-riżultati**

4.1. *Riżultati*

Sakemm mhux speċifikat mod ieħor ir-riżultati msemmija fir-rapport analitiku għandhom ikunu l-valur aritmetiku medju ottenut minn żewġ testijiet li jissodisfaw il-kriterju ta' repetizzjoni (5.1) msemmi għal dak il-metodu. Jekk il-kriterju ta' repetizzjoni mhuwiex issodisfat, allura t-test għandu jiġi ripetut, jew ir-riżultat dikjarat invalidu.

4.2. *Kalkolu tal-perċentwali*

Hlief meta speċifikat mod ieħor, ir-riżultat għandu jiġi kkalkulat bhala perċentwali skond il-massa tal-kampjun.

5. **Kriterji ta' preċiżjoni: ir-rata ta' repetizzjoni u r-riproduċibbiltà**

5.1. Il-kriterju ta' preċiżjoni mogħti f' kull proċedura hu definit kif ġej:

5.1.1. *Ir-rata ta' repetizzjoni (r)* hija l-valur li taħtu hija stabbilita d-differenza assoluta bejn żewġ riżultati ta' testijiet singoli ottenuti bl-istess proċedura fuq materjal identiku ta' kontroll, taħt l-istess kondizzjonijiet (l-istess operatur, l-istess apparat, l-istess laboratorju, u intervall qasir ta' żmien)

5.1.2. *Ir-riproduċibbiltà (R)* huwa l-valur li taħtu hija stabbilita d-differenza assoluta bejn żewġ riżultati ta' testijiet singoli ottenuti bl-istess proċedura fuq materjal identiku ta' kontroll, taħt kondizzjonijiet differenti (operaturi differenti, apparat differenti, laboratorji differenti, u/jew hin differenti).

- 5.1.3. Sakemm mhux speċifikat mod iehor il-valuri għall-kriterji ta' repetizzjoni u riproducibbiltà mogħtija fil-klawżoli relevanti ta' kull proċedura jirrapprezentaw il-95 % ta' l-intervalli tal-livell ta' kunfidenza kif definit mill-ISO 5725: it-tieni edizzjoni 1986. Huma kkalkolati mir-riżultati ta' provi kollaborattivi rikonoxxuti li kienu użati biex jevalwaw il-proċedura. Madanakollu, għal ftit mill-proċedura, provi kollaborattivi ma twettqux. F'dan il-każ il-valuri ta' rata ta' repetizzjoni u riproducibbiltà kienu stmati.
- 5.1.4. Il-provi u l-istudji kollaborattivi msemmija f'5.1.3 għandhom jiġu pjanati u kondotti skond il-linji ta' gwida internazzjonali.

6. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jispeċifika l-metodu ta' analiżi użat kif ukoll ir-riżultati ottenuti. B'żieda ma' dan, għandu jagħti kull dettal ta' proċedura użata mhux speċifikat fil-metodu ta' analiżi jew li mhux iktar ta' bilfors, kif ukoll kull ċirkostanza oħra li setgħet influwenzat ir-riżultati ottenuti. Ir-rapport tat-test għandu jagħti l-informazzjoni kollha neċessarja għall-identifikazzjoni kompleta tal-kampjun.

II. KAMPJUNI TA' HALIB MHUX IPPROĊESSAT U HALIB TRATTAT BIS-SHANA

1. L-iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni

Din il-proċedura tispeċifika l-proċedura ta' referenza biex jittieħdu kampjuni ta' halib mhux ipproċessat u halib trattat bis-shana. Il-proċeduri biex jittieħdu kampjuni u għat-trasport u l-ħażna tal-kampjuni huma applikabbli għal halib mhux ipproċessat minn kunsinni tal-produttur u għal halib mhux ipproċessat u trattat bis-shana f' tankijiet ta' ħażna u trasport.

Il-proċeduri mogħtija f' 2, 4.4, 5 u 6 huma applikabbli biex jittieħdu kampjuni ta' halib trattat bis-shana u għall-konsum dirett.

2. Ġenerali

Kampjuni ta' halib mhux ipproċessat u halib trattat bis-shana f' bottijiet, tankijiet, eċċ għandhom jittieħdu minn operatur kapaċi li kien kellu taħriġ adattat qabel ma ha fuqu l-kontroll ta' kampjuni tal-halib.

Jekk ikkunsidrat approprijat l-awtoritajiet kompetenti jew il-laboratorju ta' kontroll għandhom jistruwixxu lill-persunal li jieħdu l-kampjuni f' 'tekniki ta' stima sabiex jassiguraw li l-kampjun hu rappreżentattiv ta' u b' 'konformità mal-lott kollu.

Jekk ikkunsidrat approprijat l-awtoritajiet kompetenti jew il-laboratorju li jieħdu l-kampjuni għandhom jistruwixxu lill-persunal ta' l-istima dwar l-immarkar tal-kampjun sabiex jassiguraw l-identità mhux ambigwa tal-kampjun.

3. Tagħmir ta' l-istima

3.1. Ġenerali

It-tagħmir ta' l-istima għandu jkun magħmul minn *stainless steel*, jew materjal xieraq iehor ta' sahħa adegwata u ta' kostruzzjoni xierqa għall-iskop intiz (it-tahlit, l-istima eċċ). ċilindri u aġitaturi biex iħalltu l-likwidi f' 'kontenituri għandu jkollhom arja suffiċjenti biex jipproduċu tahlit adegwat tal-prodott, imma mingħajr ma jikkawżaw l-iżvilupp ta' toghma mranġta. Il-kuċċaruni għandu jkollhom manku solidu ta' tul biżżejjed li jkun jista' jittieħed kampjun minn kull fond tal-kontenitur. Il-kapaċità tal-kuċċarun m' għandhiex tkun inqas minn 50 ml.

Il-Kontenituri u l-ghelug ta' kampjuni għandhom ikunu tal-ħgieġ, metalli adattati jew plastiċi.

Il-materjali li minnhom it-tagħmir biex jittieħdu l-kampjuni (inklużi kontenituri u ghelug) huma magħmula m' għandhomx jikkawżaw xi tibdil fil-kampjun li jista' jaffettwa r-riżultati ta' l-eżamijiet. Is-superfiċi kollha tat-tagħmir biex jittieħdu l-kampjuni u tal-kontenituri tal-kampjuni għandhom ikunu nodfa u niexfa, lixxi u ħielsa minn xquq, u l-kantunieri għandhom ikunu tondi

3.2. It-tagħmir biex jittieħdu kampjuni għal eżami mikrobijoloġiku

It-tagħmir biex jittieħdu l-kampjuni inklużi l-kontenituri għandhom, b' 'zieda għad-dispożizzjonijiet mogħtija fi 3.1, ikun sterili.

Jekk l-istess tagħmir biex jittieħdu l-kampjuni hu użat għal kampjuni suċċessivi, għandu jitnaddaf u jiġi sterilizzat wara kull kampjun skond l-istruzzjonijiet jew il-ħtiġiet stabbiliti mil-laboratorju ta' kontroll jew mill-awtorità kompetenti u biex l-integrità tal-kampjuni suċċessivi hija ppreservata.

4. It-teknika li biha jittieħdu l-kampjuni

4.1. Ġenerali

Irrispettivament mit-testijiet li għandhom jitwettqu il-halib għandu jiħallat sew hafna qabel l-istima, b' 'mezz manwali jew mekkaniku.

Il-kampjun għandu jittieħed immedjatament wara t-tahlit waqt li l-halib ikun għadu aġitat.

Meta diversi kampjuni ta' halib fit-tankijiet jittieħdu fl-istess hin għal testijiet differenti, il-kampjun għal eżami mikrobijoloġiku għandu jittieħed l-ewwel.

Il-volum tal-kampjun għandu jkun skond il-ħtiġiet tal-kontroll. Il-kapaċità tal-kontenituri tal-kampjuni użata għandha tkun tali li huma mimlija kważi kompletament mill-kampjun, u hekk jippermettu t-tahlit sewwa tal-kontenut qabel il-kontroll, imma jevitaw li jagħqad waqt it-trasport.

- 4.2. *Kampjuni mehuda b'mod manwali*
- 4.2.1. Kampjuni minn bramel u bottijiet tal-ħalib
- Sabiex tiġi ottenuta aġitazzjoni iċ-ċilindru għandu jiċċaqlaq rapidament il fuq u l isfel fil-barmil jew fil-bott waqt li jiġi assigurat li l-ħalib hu mhawwad tajjeb u li ebda krema ma tehel ma' l-għonq tal-bott. Kampjun rappreżentattiv tal-kunsinna shiha għandu jiġi ottenut skond l-4.2.4.
- 4.2.2. Il-kampjun minn tankijiet jew vattijiet agrikoli mkessha tal-ħalib
- Il-ħalib għandu jiġi aġitat mekkanikament jew manwalment sakemm tiġi ottenuta omoġenità biżżejjed.
- Jekk il-volum tal-ħalib huwa tali li l-aġitatur mekkaniku ma jistax iħallat il-ħalib, għandha titwettag aġitazzjoni manwali.
- 4.2.3. Kampjuni minn peżatur
- Huwa essenzjali lli l-ħalib, meta mxaqleb ġewwa peżatur, jithallat b'mod adegwat. Jista jkun neċessarju li tintuża aġitazzjoni manwali jew mekkanika sabiex tiġi assigurata d-distribuzzjoni unità tax-xaħam. Meta l-volum tal-kunsinna li għandha tiġi stmata jeċċedi l-kapaċità tal-peżatur, kampjun rappreżentattiv tal-kunsinna shiha għandu jittiehed skond l-4.2.4.
- 4.2.4. Kampjun minn lott diviż
- Meta l-kwantità tal-ħalib li għandu jiġi stmat hija f' iktar minn kontenitur wiehed, għandha tittiehed kwantità rappreżentattiva minn kull kontenitur u l-kwantità tal-ħalib li għaliha jirrelata kull kampjun għandha tiġi innotata. Sakemm il-kampjuni minn kull kontenitur m'għandhomx jiġu kkontrollati individwalment, għandhom jithalltu porzjonijiet minn dawn il-kwantitijiet rappreżentattivi f' ammonti li huma proporzjonali għall-kwantità fil-kontenitur li minnu kull kampjun ittiehed. Għandu(hom) jittiehed(jittiehdu) kampjun(i) minn dawn l-ammonti proporzjonali mdaqqa wara t-taħlit.
- 4.2.5. Kampjuni minn reċipjenti kbar — tankijiet ta' hażna, tal-ferrovija u tat-triq
- 4.2.5.1. Il-ħalib għandu jithallat bi proċedura approprijata, qabel ma jittiehed il-kampjun.
- Biex jithallat il-kontenut ta' reċipjenti kbar jew ta' tankijiet ta' hażna, tat-triq jew tal-ferrovija, l-użu ta' aġitazzjoni mekkanika hu sugġerit (4.2.5.2).
- Il-livell ta' taħlit għandu jkun approprijat għall-perjodu ta' żmien li tulu l-ħalib kien wieqaf. L-effiċjenza tal-proċedura tat-taħlit applikata f' kull ċirkostanza partikolari għandha tintwera bhala adegwata għall-iskopijiet ta' l-analiżi maħsuba; il-kriterju ta' effiċjenza ta' taħlit jinfluwenza b' mod partikolari is-similitudni bejn riżultati analitiċi minn kampjuni mehuda jew minn partijiet differenti tal-kunsinni, jew mit-tank f' intervalli tul l-iskarika. Proċedura tat-taħlit tal-ħalib għandha tiġi kkunsidrata effiċjenti jekk id-differenza fil-kontenut tax-xaħam bejn iż-żewġ kampjuni, mehuda taht dawn il-kondizzjonijiet, hija inqas minn 0,1 %.
- F' reċipjent kbir bi skarika fil-qiegħ jista' jkun hemm, fil-punt ta' skarika, kwantità żgħira ta' ħalib li mhijjex rappreżentattiva tal-kontenut shih anke wara t-taħlit. Għalhekk kampjuni għandhom preferibbilment jittiehdu minn toqba (mnejn jgħaddi raġel). Jekk il-kampjuni jittiehdu mill-iskarika, għandu jithalla jiskorri ħalib biżżejjed sabiex jiġi assigurat li l-kampjuni huma rappreżentattivi ta' l-ammont shih.
- 4.2.5.2. It-taħlit tal-kontenut ta' reċipjenti kbar jew ta' tankijiet ta' hażna, tal-ferrovija jew tat-triq jista' jitwettag:
- b' aġitatur mekkaniku mibni fit-tankijiet u li jithaddem b' mutur elettriku,
 - Skrun jew aġitatur li jitmexxa b' mutur elettriku u jitqiegħed fuq it-toqba (mnejn jgħaddi raġel) bl-aġitatur sospiż fil-ħalib,
 - fil-każ ta' *tankers* tal-ferrovija jew tat-triq permezz ta' riċirkulazzjoni tal-ħalib mill-manku ta' trasferiment imqabbd mal-pompi ta' thottija tat-*tanker* u inserit ġewwa t-toqba (mnejn jgħaddi raġel).
 - permezz ta' arja nadifa kkumpressa filtrata. F' dan il-każ għandhom jintużaw il-minimu ta' pressjoni u volum ta' l-arja sabiex jiġi pprevenut l-iżvilupp ta' toghma mranġta.
- 4.3. *Kampjuni awtomatiċi jew semi-awtomatiċi*
- Strumenti ta' kampjuni awtomatiċi jew semi-awtomatiċi għall-istima ta' ħalib mhux ipproċessat minn kunsinni tal-produtturi jistgħu jintużaw skond l-istruzzjonijiet mogħtija mil-laboratorju ta' kontroll jew minn awtorità kompetenti oħra.
- Dan it-tagħmir għandu, qabel ma jintuża u f' intervalli regolari meta fl-użu, jgħaddi minn testijiet approprijati kif preskritt mill-awtorità responsabbli. L-adattabilità tal-proċeduri li bihom jittiehdu l-kampjuni għandha tiġi vverifikata sabiex jiġu stabbiliti:

- l-volum minimu ta' halib miġbur li jista' jiġi stmat kif suppost,
- ir-rata ta' kull *carry-over* (li hi relatata mal-volum minimu tal-kampjun),
- l-abbiltà li jinghata kampjun rappreżentattiv tal-lott wara aġitazzjoni xierqa.

Meta jintuza tagħmir ta' kampjuni awtomatiċi jew semi-awtomatiċi, l-awtorità kompetenti nazzjonali responsabbli tista' tippreskrivi:

- l-volum minimu ta' halib li minnu għandhom jingabru l-kampjuni,
- il-volum minimu tal-kampjun,
- il-*carry-over* massimu,
- liema analiżi tista' titwettaq jew liema prekawzjonijiet għandhomjittieħdu.

4.4. *L-istima ta' halib trattat bis-sħana għal konsum dirett f'imballaġġi bl-imnut*

Il-kampjuni ta' halib trattat bis-sħana għall-konsum dirett f'imballaġġi bl-imnut għandhom ikunu l-imballaġġ komplet issiġillat. Jekk possibbli l-kampjuni għandhom jittieħdu mill-magna ta' l-imballaġġ jew mill-kamra kiesha fl-istabbiliment ta' trattament kemm jista' jkun malajr wara l-ipproċessar. Għal halib ippasturizzat fl-istess jum ta' l-ipproċessar.

Il-kampjuni għandhom jittieħdu minn kull tip ta' halib trattat bis-sħana (pasturizzat, trattat bil-mod UHT u sterilizzat) f'numri li jikkorrispondu għall-kontrolli li jsiru u skond l-istruzzjonijiet stabbiliti mil-laboratorju ta' kontroll jew minn awtorità kompetenti oħra.

5. **L-identifikazzjonijiet tal-kampjun**

Il-kampjun għandu jiġi mmarkat b'kodiċi ta' identifikazzjoni sabiex jista' jiġi identifikat malajr bl-użu ta' struzzjonijiet mogħtija mil-laboratorju ta' kontroll jew mill-awtorità kompetenti sabiex tiġi assigurata l-identità ta' dan il-kampjun (ara 2).

6. **It-trasport u l-ħażna tal-kampjuni**

L-istruzzjonijiet dwar il-kondizzjonijiet ta' trasport, il-ħażna u hin bejn l-istima u l-analiżi tal-halib għandhom jiġu ppreparati mil-laboratorju ta' kontroll skond it-tip ta' halib u skond il-proċedura ta' analiżi li għandha tiġi użata. L-istruzzjonijiet għandhom jiġu stabbiliti skond l-awtorità kompetenti nazzjonali.

Fl-istruzzjonijiet il-punti li ġejjin għandhom jiġu inklużi:

- tul it-trasport u l-ħażna għandhom jittieħdu prekawzjonijiet sabiex tiġi pprevenuta l-espożizzjoni għal irwejjah kontaminanti u għad-dawl tax-xemx dirett. Jekk il-kontenitur użat għall-kampjuni huwa trasparenti, għandu jinħażen f'post mudlam,
- il-kampjuni ta' halib mhux ipproċessat għal analiżi mikrobijoloġika għandhom jiġu ttrasportati u mahżuna bejn 0 °C u 4 °C. Il-hin bejn meta jittieħed il-kampjun u l-analiżi għandu jkun qasir kemm jista' jkun u, f'ebda każ iktar minn 36 siegħa. L-awtorità kompetenti tista' taċċetta temperatura ta' ħażna bejn 0 °C u 6 °C jekk il-hin bejn meta jittieħed il-kampjun u l-analiżi mhux iktar minn 24 siegħa,
- kampjuni ta' halib ippasturizzat meħud għal analiżi mikrobijoloġika għandhom jiġu ttrasportati u mahżuna bejn 0 °C u 4 °C. Il-hin bejn meta jittieħed il-kampjun u l-analiżi għandu jkun qasir kemm jista' jkun u, f'ebda każ iktar minn 24 siegħa.
- il-kampjuni tal-halib ta' xort' oħra minn halib mhux ipproċessat u halib ippasturizzat għal analiżi mikrobijoloġika għandhom jiġu mahżuna fil-laboratorju taħt tkessiħ u l-hin bejn meta jittieħed il-kampjun u l-analiżi għandu jkun qasir kemm jista' jkun.

Prekawzjonijiet speċjali għal xi analiżi huma mogħtija taħt proċeduri differenti.

L-ANNEX II

WERREJ

I. Id-determinazzjoni tal-punt friża	193
II. Id-determinazzjoni ta' l-attività tal-fosfati	199
III. Id-determinazzjoni ta' l-attività perossida	202
IV. L-enumerazzjoni ta' mikro-organizmi – it-test tal-kont tal-plates bi 30 °C.....	203
V. L-enumerazzjoni ta' mikro-organizmi – it-test tal-kont tal-plates b'21 °C	208
VI. L-enumerazzjoni ta' koliformi – il-kont tal-kolonji bi 30 °C	212
VII. L-enumerazzjoni taċ-ċelloli somatiċi	216
VIII. Is-sejba ta' antibijotiċi u sulfonamidi	222
IX. Is-sejba ta' mikro-organizmi patoġeniċi	231

I. ID-DETERMINAZZJONI TAL-PUNT FRIŻA

1. L-iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni

Din il-proċedura tispeċifika l-proċedura ta' referenza għad-determinazzjoni tal-punt friża ta' halib shih, mhux ipproċessat, ippasturizzat, trattat b'UHT u sterilizzat, halib parzjalment xkumat u halib xkumat bl-użu ta' apparat (termistor krijoskopu) fejn il-banju kkontrollat termostatikament hu mkessah bi tkessiġ elettriku u sonda termistor jissostitwixxi t-termometru ta' merkurju fi hġieg.

Hemm żewġ tipi ta' strumenti disponibbli. L-ewwel huwa strument li jfittex il-punt massimu tal-friża fuq il-"pjan" fuq il-kurva ta' l-iffriżar, waqt li t-tieni wiehed, għal raġunijiet kummerċjali, hu stabbilit biex jaqra l-punt partikolari wara l-bidu tat-tkessiġ. Ladarba l-kurvi tal-punt tal-friża jistgħu iwarjaw minn halib għall-iehor u bejn il-halib u soluzzjonijiet standard użati għall-kalibrazzjoni, din il-proċedura ta' referenza teħtieġ l-użu ta' strumenti li jfittxu l-pjan. Strumenti ta' hin fiss jistgħu jintużaw għal miżuri ta' sorveljanza ta' rutina.

Il-punt tal-friża jista' jintuża biex jagħmel stima tal-proporzjon ta' ilma estranju fil-halib, sakemm l-aċidità tal-kampjun ma teċċedix 0,18 g ta' aċidu halliebi għal kull 100ml (ara 7.4).

2. It-tifsira

Il-punt friża tal-halib: Il-valur ottenut meta mkejjel skond il-proċedura deskritta u espressa fi gradi Celsius ($^{\circ}\text{C}$)

3. Il-prinċipju

Porzjon ta' test tal-halib hu mkessah hafna għat-temperatura appropjata, jiddependi fuq l-istrument u l-kristallizzazzjoni tinbeda b'vibrazzjoni mekkanika li tikkawża t-temperatura toghla malajr għal pjan li jikkorrispondi għall-iffriżar tal-kampjun.

L-istrument hu kkalbirat billi jiġi aġġustat biex jagħti l-qari korrett għal żewġ soluzzjonijiet standard, bl-użu ta' l-istess proċedura bħal għall-kampjuni tal-halib. F'dawn il-kondizzjonijiet, il-pjan jagħti l-punt friża tal-halib fi gradi *Celsius*.

4. L-apparat u l-affarijiet tal-hġieg

Tagħmir tas-soltu tal-laboratorju u, b'mod partikolari:

4.1. Il-krijoskopu

Il-krijoskopu jikkonsisti f'banju ta' tkessiġ ikkontrollat termostatikament, sonda termistor (termometru semikonduttur ta' reżistenza) b'ċirkwit assoċjat u galvanometru jew "read-out", aġitatur kampjun u strument biex jinbeda l-iffriżar flimkien ma' tubi kampjun.

4.1.1. Il-banju ta' tkessiġ

Żewġ tipi ta' banju tat-tkessiġ jistgħu jintużaw.

4.1.1.1. It-tip ta' l-immersjoni

Banju protett sewwa li jikkontjeni likwidu xieraq għat-tkessiġ, li hu mhawwad sabiex id-differenza fit-temperatura bejn xi żewġ punti fil-likwidu ma teċċedix $0,2^{\circ}\text{C}$. It-temperatura tal-likwidu m'għandhiex tvarja b'iktar minn $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ mill-valur nominali ddikjarat mill-fabbrikant.

Huwa importanti li l-likwidu fil-banju ta' tkessiġ jiġi mantnut f'livell kostanti. Is-superfici kollu tat-tubu kampjun taħt il-marka tal-volum għandu jkun kopert bil-likwidu ta' tkessiġ.

4.1.1.2. It-tip ta' ċirkolazzjoni

Nixxieġha kontinwa ta' likwidu addattat tat-tkessiġ hi ċċirkolata madwar it-tubu kampjun. It-temperatura tal-likwidu m'għandhiex tvarja b'iktar minn $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ mill-valur nominali ddikjarat mill-fabbrikant.

Likwidu addattat għat-tkessiġ huwa soluzzjoni ilma 33 % (v/v) ta' etan 1,2 diol (*ethylene glycol*).

4.1.2. It-termistor u ċ-ċirkwit miegħu

It-termistor għandu jkun ta' tip ta' sonda tal-ħġieġ, ta' dijametru mhux akbar minn $1,80 \pm 0,2$ mm u b'dijametru taċ-ċomb mhux akbar minn $0,31$ mm. Il-kostant tal-hin tat-termistor għandu jkun inqas minn żewġ sekondi u l-valur ta' β (ara n-nota) għandu jkun għoli. Il-vultaġġ ta' operazzjoni, il-kurrent u l-kostant tad-dissipazzjoni għandhom ikunu tali li t-temperatura tat-termistor ma titlax b'iktar minn $0,005$ °C 'il fuq mill-ambjent tagħha b' $-0,512$ °C It-tolleranza massima fuq ir-reżistenza għandha tkun ± 5 %.

Meta s-sonda tkun fil-pożizzjoni ta' operazzjoni fil-krijoskopu, il-ponta taż-żibġa tal-ħġieġ għandha tkun fl-assi tat-tubu kampjun u f'punt $44,6 \pm 0,1$ mm taht 'il fuq tat-tubu (ara l-figura fuq paġna 15) Għandha tiġi pprovduta *template* sabiex l-utent ikun jista jqiegħed is-sonda f'din il-pożizzjoni.

Nota

β tiddefinixxi l-karatteristiċi tat-temperatura-reżistenza tat-termistor skond il-formola:

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2}$$

fejn:

T hija t-temperatura f'Kelvin,

R hija r-reżistenza f'ohms bit-temperatura T,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} \text{ hija l-koeffiċjent tat-temperatura.}$$

β hija l-kostanti li tiddependi fuq il-materjal użat biex isir it-termistor. Fil-prattika kurrenti valur li jaq-beż it-3 000 hu rakkomandat.

4.1.3. Strument ta' kejl u *read-out*

4.1.3.1. Il-prinċipju tal-kejl

L-istrument użat għandu jopera fuq il-prinċipju ta' l-ewwel it-tifx tal-"pjan" fil-kurva tal-punt friża. Il-pjan huwa parti mill-kurva fejn it-temperatura tibqa' kostanti sa $\pm 0,002$ °C għal minimu ta' 20 sekonda.

4.1.3.2. L-operazzjoni manwali

Ir-reżistenza tat-termistor għandha tkun ibbilanċjata permezz ta' pont *Wheatstone* jew strument simili, bl-użu ta' resistors stabbli ta' l-ogħla kwalità li t-tolleranza tagħhom ma' tkunx akbar minn ± 10 % u li l-koeffiċjent tat-temperatura tagħhom ma jaqbiżx 2×10^{-5} °C.

Ir-resistor varjabbli (li jibbilanċja) m'għandux jitleq mil-linearità tul ir-range kompleta b'iktar minn 0,3 % tal-valur massimu.

Għandu jkun hemm mezz ta' aġġustar tar-reġistraturi għal skopijiet ta' kalibrizzjoni.

L-arloġġ tal-kejl għandu jkun gradwat f'intervalli mhux akbar minn $0,001$ °C

4.1.3.3. L-operazzjoni awtomatika

L-istrument *read-out* għandu jipprovi diskriminazzjoni ta' mill-inqas $0,001$ °C tul range ta' 0 sa -1 °C

L-istabbiltà ta' l-istrument *read-out* u ċ-ċirkwit assoċjat tiegħu għandhom ikunu tali li indikazzjonijiet suċċessivi ta' l-istess temperatura ma jvarjawx b'iktar minn $0,001$ °C.

Il-linearità taċ-ċirkwit għandha tkun tali li ebda żball ikbar minn $\pm 0,001$ °C ma hu introdott fxi punt fir-range $-0,400$ °C sa $-0,600$ °C meta l-istrument hu operat b'mod korrett.

4.1.4. Il-wajer għat-tahlit

Wajer tal-metall inert għall-halib u b'dijametru bejn 1 u $1,5$ mm hu użat biex jithallat il-porzjon tat-test.

Il-wajer tat-tahlit għandu jkun aġġustat għall-amplitudni u għandu jiġi mmuntat wieqaf bit-tarf tan-naħa t'isfel livell mal-ponta tas-sonda termistor. Tolleranza ta' xi $1,5$ mm 'il fuq jew 'il fuq minn din il-pożizzjoni hi permessa.

Il-wajer għat-tahlit għandu jivvibra lateralment b'amplitudni biżżejjed iddikjarata mill-fabbrikant (mhux inqas minn $+1,5$ mm) sabiex ikun assigurat li t-temperatura fil-porzjon tat-test tibqa' uniformi tul id-determinazzjoni. Febda hin tul l-operazzjoni normali tat-tahlit ma għandu l-wajer għat-tahlit jolqot is-sonda termistor jew lill-ġenb tat-tubu.

4.1.5. Strument għall-bidu ta' l-iffriżar

Dan jista' jkun kull strument li meta operat jibda instantanjament l-iffriżar tal-kampjun sabiex it-temperatura tal-porzjon tat-test toghla lejn il-punt ta' l-iffriżar. Il-wajer għat-tahlit jista' jiġi użat għal dan l-iskop; proċedura waħda hi li tiżdied l-amplitudni tal-vibrazzjoni għal minn sekonda sa żewġ sekondi sabiex il-wajer tat-tahlit jolqot lill-ġnub tat-tubu tal-kampjun.

4.1.6. Tubi tal-kampjuni

It-tubi tal-kampjuni (ara figura 1) għandhom ikunu tal-ħġieġ u jkunu $50,8 \pm 0,1$ mm twal, $16,0 \pm 0,1$ mm fid-dijametru estern u $13,5 \pm 0,1$ mm fid-dijametru intern. Il-ħxuna tal-ġnub tul it-tubu m'għandhiex tvarja b'iktar minn 0,1 mm.

It-tubi għandu jkollhom marka ta' volum $29,8$ mm taht it-tarf (21 mm fuq in-naha t'isfel tat-tubu) sabiex tindika l-volum kampjun ta' $2,5 \pm 0,1$ ml.

4.1.7. Il-fornitura ta' l-elettriku

Il-vultaġġ ta' forniture għandu jiġi stabilizzat, jew fl-apparat jew esternament sabiex il-varjazzjoni ma taqbiż $\pm 1\%$ tal-valur nominali meta l-fornitura tal-*mains* tvarja b' $\pm 6\%$.

4.2. Il-bilanċ analitiku

4.3. Kunjetti volumetriċi ta' marka waħda, kapacità ta' 1 000 ml, klassi A.

4.4. Forn għat-tnixxif, ventilat tajjeb, kapaci li jmantni temperatura ta' 130 ± 1 °C

jew

Forn elettriku, ventilat, kapaci li jmantni temperatura ta' 300 ± 25 °C

4.5. Dessikatur

5. Ir-riagenti

5.1. Ilma borosilikat distillat mill-ħġieġ, mġholli u mkessah sa 20 ± 2 °C f'kunjett b'tubu li jassorbi d-djiossidu tal-karbut.5.2. Il-klorur tas-sodju, kwalità ta' riagent analitika, mithun tajjeb, immnixxef għal hames sigħat bi 300 ± 25 °C f'forn jew alternattivament immnixxef f'forn b' 130 ± 1 °C għal mill-inqas 24 siegħa u mkessah għat-temperatura tal-kamra f'dessikatur effiċjenti.

5.3. Il-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet standard

Iżen l-ammont approprijat (ara Tabella 1) ta' klorur tas-sodju niexef (5.2) fi flixkun ta' l-użin. Holl filma distillat (5.1), ittrasferixxi kwantitattivament għall-marka 1 000 ml f'kunjett volumetrik u žid sal-marka bl-ilma f' 20 ± 2 °C

Ahžen f'madwar 5 °C fi flixken tal-poliutilin magħluqin sewwa ta' kapacità mhux akbar minn 250 ml għal mhux iktar minn xahrejn.

Il-punt tal-friza tas-soluzzjonijiet tal-klorur tas-sodju f' 20 °C

g NaCl/l	°C
6,859	-0,408
7,818	-0,464
8,149	-0,483
8,314	-0,492
8,480	-0,502
8,646	-0,512
8,811	-0,521
8,977	-0,531
9,143	-0,541
10,155	-0,600

Qabel ma tintuża s-soluzzjoni standard, il-flixxkun għandu jiġi maqlub bil-mod u mdawwar diversi drabi sabiex jithallat sew il-kontenut tiegħu. Febda hin ma għandha s-soluzzjoni standard tiġi aġitata b'mod vjolenti sabiex tinkorpora l-arja.

Kampjuni ta' soluzzjoni standard għandhom jittiehdu mill-flixxkun billi titferra' s-soluzzjoni f'buqar nadif niexef, jiġifieri l-pipetti ma għandhom qatt jintużaw għal dan l-iskop.

Is-soluzzjonijiet m'għandhomx jintużaw minn fliexken mimlijin inqas minn kwart, u jekk mhux ippreservati b'funġiċidi (per eżempju soluzzjoni tijomersali, 10 g/l), m'għandhomx jintużaw jekk għandhom iktar minn xahrejn.

6. Il-kalibrazzjoni tal-krijoskopu termistor

Il-krijoskopu għandu jkun stabbilit sabiex it-temperatura ta' l-arja ambjentali ma tiddevjax iktar minn 1 °C mit-temperatura li fiha l-kalibrazzjoni hi mwettqa. Il-krijoskopu m'għandux ikun espost għad-dawl tax-xemx jew għall-kurrent f'temperatura 'l fuq minn 26-27 °C

Għandu jkun assigurat li l-krijoskopu hu f'kondizzjoni operattiva tajba skond l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant, u li kien mixgħul għal mill-inqas 12-il siegħa qabel il-kalibrazzjoni. Għandha tiġi kkontrollata l-pożizzjoni tas-sonda, l-amplitudini tal-wajer tat-tahlit li jivvibra u t-temperatura tal-likwidi li jkesshu.

Għandhom jintgħażlu żewġ soluzzjonijiet standard (ara t-Tabella 1 fuq) li joqorbu għall-valur mistenni tal-punt ta' l-iffriżar tal-kampjuni tal-halib li għandhom jiġu eżaminati. Id-differenza fil-punti ta' l-iffriżar bejn iż-żewġ soluzzjonijiet m'għandhiex preferibbilment tkun inqas minn - 0,100 °C

(F'xi disinni ta' krijoskopu kurrentement disponibbli iċ-ċirkwit assoċjat mat-termistor hu ddisinjat biex ikun ibbilanċjat fuq valur speċifiku ta' punt ta' l-iffriżar fir-range tal-kejl ta' l-istrument. F'dawn il-każijiet l-użu ta' soluzzjoni standard li jkollha l-punt ta' l-iffriżar b'hal waħda mis-soluzzjonijiet ta' kalibrazzjoni jiffaċilita l-proċedura tal-kalibrazzjoni, u l-fabbrikant għandu jindika dan il-valur).

Pipetta 2,5 ± 0,1 ml ta' standard wiehed f'tubu kampjun standard nadif, niexef u opera l-krijoskopu.

Nota:

It-tubi tal-kampjuni użati tul il-kalibrazzjoni għandhom ikunu magħmula mill-istess tip ta' ħġieġ u maħsula u mlahalha b'ilma dimineralizzat fl-istess hin b'hal dawk użati tul it-test tal-kampjuni tal-halib. It-temperaturi tas-soluzzjonijiet standard għandhom ikunu simili għal dawk tal-kampjuni tal-halib.

Għandhom jiġu aġġustati l-kontrolli tal-kalibrazzjoni, kif indikat mill-fabbrikant, sakemm il-qari tal-krijoskopu ikun ugwal għall-punt friża tas-soluzzjoni standard. Il-proċedura għandha tiġi ripetuta bis-soluzzjoni standard l-oħra, u tibqa' talterna b'dan il-mod sakem qari suċċessiv fuq kull soluzzjoni, mingħajr iktar aġġustament tal-kontrolli tal-kalibrazzjoni, jagħti l-valur korrett tal-punt friża ta' kull wiehed. Il-krijoskopu hu m'bagħad lest għall-użu u jindika direttament il-punt friża tal-kampjun tal-halib mingħajr applikazzjoni ta' xi korrezzjoni.

7. Il-preparazzjoni tal-kampjun tat-test

- 7.1. Il-kampjuni għandhom jiġu maħżuna, jekk neċessarji, f'temperatura bejn iż-0 u 1 - 5 °C
- 7.2. Għandha titneħħa kull entità barranija viżibbli jew xaham tal-butir solidu mill-kampjun, jekk neċessarju bil-filtrazzjoni f'kontenitur nadif, niexef, u l-kampjun jithallat bil-mod. Il-filtru, jekk użat, għandu jkun inert għall-halib u għandu jkun effettiv meta użat f'temperatura ta' laboratorju.
- 7.3. Il-halib jista' jiġi eżaminat meta jkun fit-temperatura ta' hażna tiegħu (bejn 0 u 5 °C) jew jista' jithalla jasal għal temperatura tal-laboratorju immedjatament qabel jinbada t-test. Madanakollu, huwa neċessarju li s-soluzzjonijiet standard u l-kampjuni tal-halib huma fl-istess temperatura meta użati.
- 7.4. Għandha tiġi determinata l-aċidità titratabili tal-halib kemm jista' jkun fl-istess hin b'hal-punt friża tat-test. Il-kampjuni b'aċidità li teċċedi 0,18 g għal kull 100ml tal-halib ma jistgħux jiġu eżaminati
- 7.5. Halib trattat bil-UHT u sterilizzat għandu joqgħod għal mill-inqas 20 minuta f'kontenitur miftuħ qabel l-eżami.

8. **Il-proċedura**8.1. *Kontrolli preliminari*

Għandu jiġi kkontrollat li l-livell u t-temperatura tal-likwidu li jkessah huma skond l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant u li, jekk approprijat, is-sonda termistor hija f'tubu vojta ta' kampjun fil-post tal-kampjuni. Għandu jinxteghel il-krijoskopu u jiġi assigurat li l-likwidu li jkessah qed jiġi mhallat jew iċċirkolat sewwa, kif approprijat Meta l-krijoskopu ikun inxteghel għal mill-inqas 12 –il siegħa, għandha tiġi kkontrollata t-temperatura tal-likwidu li jkessah u l-pożizzjoni u l-amplitudini tal-vibrazzjoni tal-wajer li jhallat.

8.2. *L-eżami rutina ta' kalibrazzjoni*

Qabel kull prova, għandu jitkejjel il-punt friża tas-soluzzjoni standard tal-klorur tas-sodju (e.ż. soluzzjoni bil-punt friża – 0,512 °C) sakemm żewġ determinazzjonijiet konsekuttivi ma jvarjawx b'iktar minn 0,001 °C Jekk il-medja ta' dawn il-valuri tvarja mill-punt friża tas-soluzzjoni standard b'iktar minn 0,002 °C il-krijoskopu għandu jerġa jiġi kkalibrat kif deskritt f'6.

Jekk il-krijoskopu huwa fużu kontinwu, wettaq l-eżami rutina ta' kalibrazzjoni. Jekk il-krijoskopu huwa fużu kontinwu, wettaq l-eżami rutina ta' kalibrazzjoni mill-inqas darba f'siegħa. L-istruzzjonijiet tal-fabbrikant għandu jittiehed kont tagħhom.

8.3. *Id-determinazzjoni tal-punt friża tal-halib*

Bil-mod aqleb u dawwar il-flixxun tal-kampjun tal-halib hafna drabi jithallat il-kontenut. F'ebda hin ma għandu l-kampjun ikun aġitat daqshekk bil-goff li jinkorpora l-arja.

Ippipetta 2,5 ± 0, 1 ml tal-halib f'tubu ta' kampjun, nadif, niexef, u nehhi xi eċċess b'pipetta. Assigura li s-sonda u l-wajer tat-tahlit huma nodfa u niexfa, jekk neccessarju, billi jintmeshu b'attenzjoni b'tessut minghajr tnietex minn isfel għal fuq.

Inserixxi t-tubu ta' kampjun fil-krijoskopu kalibrat skond l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant. Il-halib jiksa u jibda l-iffriżar f'temperatura speċifikata mill-fabbrikant f' 0,1 °C

(F'xi strumenti awtomatiċi din it-temperatura tista' tiġi osservata fuq ir-*read-out* diġitali; fuq strumenti manwali il-precizzjoni neccessarja tintlaħaq billi jiġi assigurat li l-iffriżar jibda meta l-vleġġa jew il-linja fuq il-galvanometru jikkoinċidu mal-marka approprijata).

Jekk, għal xi raġuni, l-iffriżar jibda qabel jew wara *r-range* ta' temperatura speċifikata it-test għandu jithalla u jiġi ripetut b'porzjon ta' test iehor tal-halib. Jekk il-kampjun ta' repetizzjoni wkoll jiffriża qabel it-temperatura speċifikata, porzjon iehor tal-kampjun għandu jissahhan sa 45 °C u jinżamm għal hames minuti biex jippermetti t-tidwib tax-xaham tal-kristallini.

Imbagħad għandu jerġa jithalla jksah għat-temperatura ta' *testing* u jiġi eżaminat immedjatament. It-temperatura tal-halib wara l-bidu ta' l-iffriżar toghla rapidament għal valur li jibqa' virtwalment kostanti għal xi hin qabel ma jerġa jinżel. Il-punt ta' ffrizjar jikkorrispondi għall-ogħla temperatura milluq tul dan il-perjodu u dan il-valur għandu jiġi rreġistrat.

Nota

Il-hin li tulu t-temperatura tibqa' kostanti u l-intervall tal-hin bejn il-bidu ta' l-iffriżar u meta tintlaħaq l-ogħla temperatura jvarjaw minn kampjun għal kampjun u jkunu konsiderevolment iqsar għall-ilma u soluzzjonijiet standard tal-klorur tas-sodju milli għall-halib. Huwa essenzjali li tkun l-ogħla temperatura li tiġi rreġistrata.

Meta l-kejl ikun ġie kompletat b'mod sodisfaċenti, it-tubu għandu jitneħħa, is-sonda termistor għandha titlaħ-lah bl-ilma u mbagħad tiġi xxuttata u mhallta b'tessut minghajr tnietex, artab, nadif minn isfel għal fuq u mbagħad issir determinazzjoni duplikata fuq porzjon iehor tal-kampjun tal-halib.

Jekk id-differenza bejn il-punti friża ottenuti hija ikbar mill-valur ta' repetizzjoni (0,004 °C), għandha tit-wettaq determinazzjoni duplikata fuq porzjon iehor tal-kampjun. Sakemm iż-żewġ determinazzjonijiet jaqblu sa bejn 0,004 °C, il-valuri għandhom jiġu rreġistrati u użati biex jikkalkulaw ir-riżultat finali.

8.4. *It-tkessiħ tas-sonda*

Wara li jintuża l-istrument, għandu jitqiegħed tubu ta' kampjun vojta fil-hofra tal-kampjuni u titbaxxa r-ras operattiva sabiex is-sonda tinżamm kiesha. (F'ċerti disinni ta' krijoskopu dan jista' ma jkunx possibbli; f'dawn il-kazijiet, huwa essenzjali li jiġi assigurat li s-sonda titkessah b'mod adegwat qabel ma jittiehdu l-mizuri, per eżempju, billi jsiru diversi determinazzjonijiet finti sakemm ikun ottenut qari konsistenti).

9. L-espressjoni tar-riżultati

9.1. Il-kalkolu

Jekk, wara l-kontroll ta' kalibrazzjoni rutina, il-kalibrazzjoni tkun ikkonfermata, għandha tiġi kkalkulata l-medja tal-valuri tal-punt tal-friza duplikati aċċettabbli ottenuti arrotondati sat-tielet post deċimali.

Jekk is-somma ta' żewġ valuri aċċettabbli duplikati hi numru fard, il-medja għandha tiġi arrotondata sa l-egreb valur biż-żewġ kif muri fl-eżempju li ġej:

Il-punt tal-friza (°C)

Valuri duplikati		Medja
0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

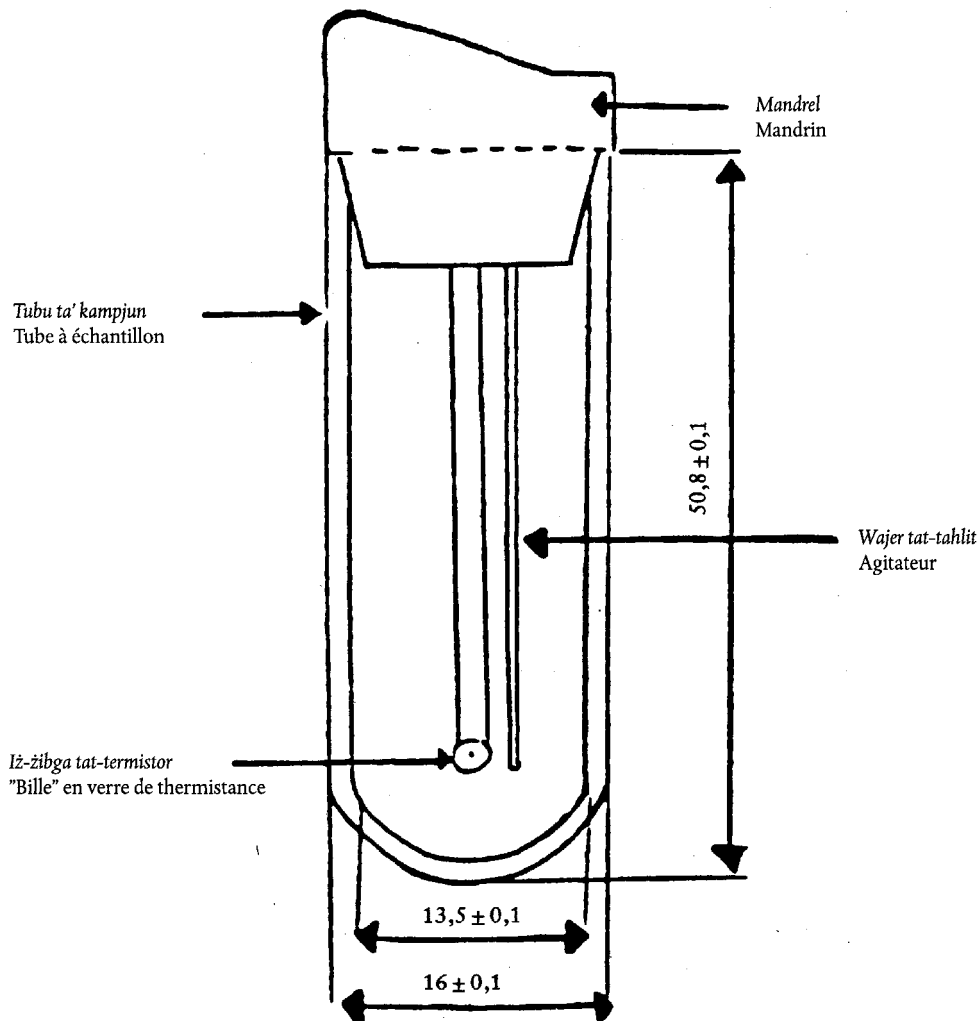
9.2. Il-preċiżjoni

9.2.1. Ir-rata ta' Repetizzjoni (r): 0,004 °C.

9.2.2. Ir-Riproduċibbiltà (R): 0,006 °C.

Figura 1

Dettall tal-Krijoskopju Termistor 4.1 (pożizzjoni ta' tubu kampjun relata maż-żibga termistor u mal-wajer tat-tahlit



Id-dimensjonijiet kollha f'mm
Toutes dimensions en mm

II. ID-DETERMINAZZJONI TA' L-ATTIVITÀ BIL-PHOSPHATASE

1. L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni

Din il-proċedura tispesifika l-proċedura ta' referenza għad-determinazzjoni ta' l-attività *phosphatase* f'halib pasturizzat.

2. Tifsira

2.1. *L-attività tal-phosphatase* hija miżura tal-kwantità ta' *phosphatase* alkalini attivi preżenti fil-prodott, espressi bhala kwantità ta' fenol, f'mikrogrammi, liberat taht il-kondizzjonijiet imsemmija fil-proċedura b'1 ml tal-halib ippasturizzat.

2.2. Kull halib li l-attività *phosphatase* tiegħu hi taht 1-4 mg/ml hu kkunsidrat li jkun negattiv *phosphatase*.

3. Il-prinċipju

L-attività *phosphatase* hi evalwata mill-ammont tal-fenol liberat mill-fenil-fosfat tad-disodju miżjud mal-kampjun. Il-fenol illiberat jirreaġixxi mad-*dibromoquinonechlorimide* u jipproduċi *dibromoindophenol* (blu fil-kulur) li hu mkejjel kulurmetrikament f' 610 nm. Isir paragun mal-kampjun meta l-enzima tal-fosfat tkun giet distrutta.

4. Ir-riagenti

4.1. *Buffer* ta' l-idrossidu borat tal-Barjum

4.1.1. Holl 50,0 g ta' idrossidu tal-barjum[Ba(OH)₂·8H₂O]fl-ilma u židu sa 1 000 ml.

4.1.2. Holl 22,0 g ta' acidu boriku[H₃BO₃]fl-ilma u židu sa 1 000 ml.

4.1.3. Sahħan 500 ml ta' kull soluzzjoni sa 50 °C, hallat is-soluzzjonijiet, kessah rapidament sa madwar 20 °C, agġusta l-pH, jekk neċessarju sa 10,6 ± 0, 1 bl-addizzjoni tas-soluzzjoni 4.1.1 jew 4.1.2. Iffiltra. Ahżen is-soluzzjoni f'kontenitur magħluq sewwa.

4.1.4. Iddilwa qabel l-użu b'volum ugwali ta' ilma.

4.2. *Buffer* ta' l-iżvilupp tal-kulur

Holl 6,0 g ta' metaborat tas-sodju (NaBO₂)jew 12,6 g ta' (NaBO₂·4H₂O), u 20,0 g ta' klorur tas-sodju (NaCl) fl-ilma u žid sa 1 000 ml.

4.3. *Buffer* tad-dilwizzjoni tal-kulur

Iddilwa 10 ml tal-*buffer* ta' żvilupp tal-kulur (4.2) ma' 100ml bl-ilma.

4.4. *Is-substrat tal-buffer*

Holl 0,1 g ta' deidrat tal-fenilfosfat tad-disodju hieles mill-fenol f'100ml ta' *buffer* (4.1.3) jew holl 0,5 g ta' fenilfosfat tad-disodju f'4,5ml tal-*buffer* ta' żvilupp tal-kulur (4.2), žid żewġ qatriet tas-soluzzjoni BQC (4.6) u halli f'temperatura tal-kamra għal 30 minuta. Il-kulur hekk iffurmat għandu jiġi estratt b'2,5ml ta' *butan-1-ol* u jithalla sakemm il-*butan-1-ol* hu sseparat. Nehħi l-*butan-1-ol* u armi. Din l-estrazzjoni għandha tiġi ripetuta jekk neċessarju.

Is-soluzzjoni tista' tinhażen fi frigg għal ftit jiem; żviluppa l-kulur u irrepeti l-estrazzjoni qabel l-użu. Ipprepara s-substrat tal-*buffer* immedjatament qabel l-użu billi tiddilwa 1ml ta' din is-soluzzjoni ma' 100ml bil-*buffer barium borate-hydroxide*.

4.5. *Il-precipitant taż-żingu-tar-ramm*

Holl 3,0 g tas-sulfat taż-żingu (ZnSO₄·7H₂O) u 0,6 g tas-sulfat tar-ramm (II) (CuSO₄·5H₂O) fl-ilma u žid sa 100ml.

4.6. *2,6- Is-soluzzjoni tad-Dibromoquinonechlorimide* (Soluzzjoni BQC)

Holl 40 ± 1 mg ta' 2,6-dibromoquinonechlorimide (BQC) (C₆H₂Br₂CINO₆) f' 10 ml ta' 96 % (v/v) etanol.

Ahżen fi flixxun bil-ħgieġ skur fi friġġ. Armi jekk huwa skulurat jew ta' żmien iktar minn xahar.

4.7. *Soluzzjoni tas-sulfat tar-ramm (II)*

Holl 0,05 g tas-sulfat tar-ramm (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) fl-ilma u žid sa 100 ml.

4.8. *Is-soluzzjonijiet standard tal-fenol.*

4.8.1. Iżen 200 ± 2 mg ta' fenol anidridu pur, ittrasferixxi għal kunjetta volumetrika ta' 100ml, žid l-ilma, hallat u žid sal-marka. Din is-soluzzjoni stock tibqa' stabbli għal diversi xhur fi friġġ.

4.8.2. Iddilwa 10 ml tas-soluzzjoni stock ma' 100ml ilma u hallat. 1ml jikkontjeni 200 mg ta' fenol.

5. **Apparat u affarijiet tal-ħgieġ**

Noti:

- (a) L-affarijiet tal-ħgieġ, l-istoppers u l-ghodda kollha biex jittieħdu l-kampjuni għandhom jtnadddu b'attenzjoni. Hu rakkomandat li jitlaħhalu b'ilma mgholli distillat frisk jew li jifawru.
- (b) Ċerti tipi ta' stoppers tal-plastik jistgħu jikkawżaw kontaminazzjoni fenolika u l-użu tagħhom m'għandux ikun permess.

It-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u, b'mod partikolari:

5.1. *Il-bilanċ analitiku*

5.2. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jinżamm $f37 \pm 1$ °C.

5.3. Spettrofotometru tajjeb għal qari fuq *wavelength* ta' 610 mm.

5.4. *Test tubes*, 16 jew 18 mm \times 150 mm, preferibbilment gradwati b' 5 u 10 ml.

5.5. *Pipetti*

5.6. Lenbuti tal-ħgieġ ta' daqs konvenjenti, per eżempju 5 ċm f'dijametru.

5.7. Filtri mitwija mill-inqas 9ċm f'dijametru għal velocità medja ta' filtrazzjoni.

5.8. Kunjetti volumetriċi għall-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet standard.

6. **Il-proċedura**

Noti:

- (a) Għandha tiġi evitata l-influenza ta' dawl tax-xemx dirett tul id-determinazzjoni.
- (b) Kontaminazzjoni bi traċċi ta' riq jew għaraq tista' tagħti riżultati pożittivi foloz u għandha tiġi evitata. F'dan ir-rigward, għandha tingħata attenzjoni speċjali lill-proċedura ta' l-ippippetar.

6.1. *Il-preparazzjoni tal-kampjun tat-test*

6.1.1. Wettaq l-analiżi direttament wara li jittieħed il-kampjun. Inkella, żomm il-kampjun fi friġġ, imma għal mhux iktar minn jumejn.

6.2. *Il-porzjon tat-test*

Ippipetta f'kull wieħed miż-żewġ *test tubes* (5.4) 1 ml tal-kampjun tat-test, bl-użu ta' tubu wieħed bħala kontroll jew vojtt.

6.3. *Determinazzjoni*

6.3.1. Sahħan il-vojt għal żewġ minuti filma mgholli; kopri *t-test tube* u l-buqar ta' l-ilma jagħli b'*foil* ta' l-aluminju sabiex ikun assigurat li t-tubu sħiħ ikun sħun. Kessaħ malajr għat-temperatura tal-kamra.

6.3.2. Itratta l-vojt u l-kampjun tat-test b'mod simili għall-bqija tal-proċedura. Žid 10 ml tas-substrat tal-*buffer* (4.4) u hallat.

- 6.3.3. Il-kampjuni għandhom jitqiegħdu f'inkubazzjoni immedjatement fil-banju ta' l-ilma (5.2) għal 60 minuta, u l-kontenut għandu jithallat okkażjonalment (mill-inqas erba' darbiet).
- 6.3.4. Sahħan filma jagħli għal żewġ minuti bl-istess mod kif taht 6.3.1. Kessaħ malajr għat-temperatura tal-kamra.
- 6.3.5. Żid 1 ml ta' precipitant tar-ramm- taż-żingu (4.5) ma' kull tubu u hallat sew.
- 6.3.6. Iffiltra minn karta niexfa tal-filtru, armi l-ewwel 2 ml, erġa' ffiltra jekk neċessarju sakemm il-filtrat hu kompletament ċar, u iġbor 5ml *test tube*.
- 6.3.7. Żid 5 ml tal-*buffer* ta' l-iżvilupp tal-kulur (4.2).
- 6.3.8. Żid 0,1ml tas-soluzzjoni BQC (4.6), hallat u halli l-kulur jizviluppa għal 30 minuta fit-temperatura tal-kamra.
- 6.3.9. Kejjel l-assorbiment kontra l-kontroll jew il-vojt fl-ispetrofotometru (5.3) $f_{wavelength}$ ta' 610 nm.
- 6.3.10 Irrepeti d-determinazzjoni b'dilwizzjoni approprijata tal-kampjun jekk l-assorbiment kif imkejjel taht 6.3.9 jeċċedi l-assorbiment ta' l-istandard li jikkontjeni 20 mg tal-fenol għal kull tubu kif imkejjel taht 6.4.4. Ipprepara din id-dilwizzjoni billi thallat volum tal-kampjun tat-test ma' volum approprijat ta' parti ta' l-istess kampjun tat-test b'attenzjoni sat-toghlija sabiex il-*phosphatase* ikun diattivat.
- 6.4. *Il-preparazzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni*
- 6.4.1. Ipprepara *range* approprijat ta' standards dilwiti, billi tibda mill-fenol standard (4.8.2.), li jikkontjeni 0 (kontroll jew vojt), 2,5, 10 u 20 mg ta' fenol għal kull millimetru u pippetta rispettivament 1 ml ta' ilma u 1 ml ta' l-erba' soluzzjonijiet standard tal-fenol f'kull wiehed mill-*hames test tubes*.
- 6.4.2. Żid ma' kull *test tube* 1ml tas-soluzzjoni tas-sulfat tar-ramm (II) (4.7), 5 ml tal-*buffer* tad-dilwizzjoni tal-kulur (4.3), 3 ml ta' ilma u 0,1 ml tas-soluzzjoni BQC (4.6); hallat.
- 6.4.3. Halli l-kulur jizviluppa għal 30 minuta f'temperatura tal-kamra.
- 6.4.4. Kejjel l-assorbiment kontra l-kontroll jew il-vojt fl-ispetrofotometru $f_{wavelength}$ ta' 610 nm (5.3).
- 6.4.5. Mill-valuri ta' l-assorbiment (6.4.4) ottenut għal kull kwantità ta' fenol miżjud (6.4.1), ikkalkula l-linja ta' rigress skond il-proċedura ta' l-inqas kaxxi.

7. L-espressjoni tar-riżultati

- 7.1. *Il-kalkolu u l-formula*
- 7.1.1. Ikkalkula mill-qari ta' l-assorbiment (6.3.9) il-kwantità tal-fenol bl-użu tal-linja ta' rigress ottenuta (6.4.5)
- 7.1.2. Ikkalkula l-attività tal-*phosphatase*, espressa bħala mikrogrammi ta' fenol għal kull millimetru tal-halib pas-turizzat mill-formula li ġejja:
- $$\text{L-attività tal-phosphatase} = 2,4 \times A \times D$$
- Fejn
- A hija l-kwantità ta' fenol f'mikrogrammi ottenuta taht 7.1.1;
- D huwa l-fattur ta' dilwizzjoni skond 6.3.10 (fil-każ ta' ebda dilwizzjoni, D = 1);
- Il-fattur 2,4 huwa l-fattur ta' dilwizzjoni (5/12 ta' kampjun tat-test ta' 1 ml) – Ara 6.2. inkonnessjoni ma' 6.3.2, 6.3.5 u 6.3.6
- 7.2. *Il-precizjoni*
- 7.2.1. Ir-rata ta' repetizzjoni (r): 2 µg fenol/ml.
- 7.2.2. Ir-Riproduċibbiltà (R): 3(preliminarju) µg fenol/ml.
- 7.2.3. Jekk id-dilwizzjoni hija applikata skond 6.3.10 il-limitu msemmi f' 7.2.1 u 7.2.2. hu msemmi fir-riżultati ottenuti fuq il-kampjun ta' dilwizzjoni.

III. ID-DETERMINAZZJONI TA' L-ATTIVITÀ TAL-PEROXIDASE

1. L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni

Din il-proċedura tissimplifika l-proċedura ta' referenza għad-determinazzjoni tal-preżenza jew l-assenza ta' l-enzima ta' *peroxidase* fil-halib bħala kontroll ta' pasturizzazzjoni.

2. Tifsira

Peroxidase - reazzjoni pożittiva:

Jekk il-halib hu ppasturizzat kif suppost jiffirma kulur blu fi żmien 30 sekonda wara t-tahlit.

Peroxidase - reazzjoni negattiva:

Ebda kulur ma jsehh fi żmien 30 sekonda wara t-tahlit.

3. Il-prinċipju

L-enzima tal-*peroxidase* tiddikomponi l-perossidu ta' l-idroġenu. L-ossigenu atomiku liberat jossida l-1,4 *phenylenediamine* mingħajr kulur fl-indofenolu vjola (it-test *Storch*) L-intensità tal-kulur hi proporzjonali għall-konċentrazzjoni ta' l-enzima.

4. Ir-riagenti

4.1. Soluzzjoni ta' 1,4-phenylenediamine

Holl 2 g 1,4 *phenylenediamine* ($C_6H_8N_2$) f'ilma shun (50 °C) u žid sa volum ta' 100 ml. Żomm is-soluzzjoni fi flixxun kannella skur b' tapp tal-ħġieġ u ahžen f'post kiesaħ u fid-dlam. Wara l-preparazzjoni, soluzzjoni ta' 1,4 - *phenylenediamine* tiffirma sediment fi żmien jum jew jumejn: għandha mbagħad tintrema.

4.2. Soluzzjoni tal-perossidu ta' l-idroġenu

Iddilwa 9 ml ta' perossidu ta' l-idroġenu 30 % fl-ilma u žid sa volum ta' 100 ml. Biex tistabilizza, žid 1ml aċidu tal-kubrit ikkonċentrat għal kull litru ta' soluzzjoni.

Is-soluzzjoni tal-perossidu ta' l-idroġenu huwa stabbli għal xahar, jekk miżmum f'post kiesaħ fid-dlam u fi flixxun b' tapp tal-ħġieġ li jipprevieni kull kuntatt ma' komposti organiċi.

5. Il-proċedura

5.1. Inserixxi 5ml tal-kampjun tal-halib f'*test tube* nadif b'għeluq xieraq.

5.2. Žid 5 ml tas-soluzzjoni *phenylenediamine* 1,4 (4.1).

5.3. Žid 2 qatriet tas-soluzzjoni tal-perossidu ta' l-idroġenu (4.2).

5.4. Osserva l-produzzjoni tal-kulur fi żmien 30 sekonda wara t-tahlit Jekk jiġi prodott il-kulur blu iktar tard minn 30 sekonda wara ż-żieda tar-riagenti ir-reazzjoni mhijiex speċifika.

IV. L-ENUMERAZZJONI TA' MIKRO-ORGANIŻMI — IT-TEST TAL-KONT TAL-PLATES F' 30 °C

1. L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni

Din il-proċedura tispeċifika l-proċedura ta' referenza għall-enumerazzjoni ta' mikroorganismi permezz ta' teknika ta' kont tal-kolonji b' 30 °C. Din il-proċedura hija applikabbli għal halib mhux ipproċessat u għal halib pasturizzat u għal halib trattat bl-UHT u halib sterilizzat preinkubat fi 30 °C għal 15-il ġurnata.

2. Tifsira

In-nominazzjoni "mikro-organismi" tfisser: organiżmi li jiffurmaw kolonji li jstgħu jingħaddu meta inkubati ajrubikament taht il-kondizzjonijiet deskritti.

3. Il-prinċipju

Volum definit tal-kampjun tal-halib hu mhallat mal-*medium* ta' kultura f' kontenituri Petri u inkubat f' 30 °C għal 72 siegħa. Il-kolonji huma magħduda u n-numru ta' mikro-organismi għal kull 1ml ta' halib mhux ipproċessat jew pasturizzat jew għal kull 0,1ml ta' halib preinkubat trattat b'UHT jew sterilizzat hu kkalkulat.

4. Apparat u affarijiet tal-ħgieg

It-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u, b'mod partikolari:

4.1. L-apparat

4.1.1. Forn ta' l-arja sħuna, kapaċi li jopera f' 170 sa 175 °C

4.1.2. Awtoklavi, kapaċi li jopera f' 121 ± 1 °C.

4.1.3. Inkubatur, kapaċi li jmantni temperatura ta' 30 ± 1 °C fil-punti kollha fih.

4.1.4. pH-meter, b'kompens ta' temperatura, eżatt sa ± 0, 1 unità pH.

4.1.5. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jopera f' 45 ± 1 °C.

4.1.6. Lenti, ingrediment effettiv 2 – 4x

4.1.7. Lenti, ingrediment effettiv 8 – 10x

4.1.8. Il-kont tat-talja.

4.1.9. Mixer kapaċi jhallat 1 ml tal-kampjun ta' halib jew dilwizzjoni deċimali ma' 9ml dilwent u li jaħdem fuq il-prinċipju ta' rotazzjoni eċċentrika tal-kontenut tat-test tube.

4.2. Affarijiet tal-ħgieg

4.2.1. Test tubes b'għeluq xieraq u b'kapaċità biżżejjed biex jikkontjenu, bi spazju fuq biżżejjed għat-tahlit, 10 ml tad-dilwizzjoni primarja jew dilwizzjonijiet deċimali ohrajn.

4.2.2. Kunjetti ta' kapaċità 150 sa 250 ml jew tubi, madwar 20ml kapaċità, biex iżommu l-*medium* tal-kultura.

4.2.3. Pipetti (miżduda bit-tajjar) tal-ħgieg jew ta' materjal sterili sintetiku b'ponta mhux miksura ta' kapaċità nominali ta' 1ml u li jkollhom fetha ta' dijametru 1,75 sa 3 mm.

4.2.4. Kontenituri Petri, ta' ħgieg ċar mhux ikkullurit jew materjal sterili sintetiku, bil-kontenitur fil-qiegħ li jkollu dijametru intern ta' madwar 90 – 100 mm. Il-fond intern għandu jkun ta' minimu ta' 10 mm. Il-qiegħ ma għandu jkollu ebda irregolarità li tithallat mal-kolonji ta' l-għadd.

4.2.5. L-isterilizzazzjoni ta' l-affarijiet tal-ħgieg:

L-affarijiet tal-ħgieg għandhom ikunu sterilizzati b'wahda mill-proċeduri li ġejjin:

(a) billi jinżammu f'170 sa 175 °C għal mhux inqas minn siegħa f'forn ta' l-arja sħuna (4.1.1);

(b) billi jinżammu f'121 ± 1 °C għal mhux inqas minn 20 minuta f'awtoklavi (4.1.2).

Fl-awtoklavi għandu jkun hemm attenzjoni biex tiġi assigurata penetrazzjoni adegwata ta' fwar – eż. jekk it-tagħmir hu sterilizzat f'kontenituri, dawn m'għandhomx ikunu magħluqin issikkati, il-kunjetti għandu jkollhom għotjien mahlula.

Affarijiet tal-ħġieġ sterilizzati fl-awtoklavi għandhom jitnixxfu billi jiġi ventilat il-fwar.

Il-pipetti għandhom jiġu sterilizzati f'forn bl-arja shuna (4.1.1)

5. **Il-Medium ta' kultura – il-kont tal-plates tal-halib agar–**

5.1 *Il-Kompożizzjoni:*

Estratt tal-hmira	2,5 g
Trittonju	5,0 g
Glukosju (D) jew Dextrose	1,0 g
Trab tal-halib xkumat	1,0 g
Ilma	1 000 ml

It-trab tal-halib xkumat għandu jkun magħmul minn sustanzi inibitorji. Dan għandu jiġi verifikat b'testijiet komparattivi li jużaw trab tal-halib xkumat hieles minn sustanzi inibitorji.

Il-preparazzjoni

Issospendi u holl il-komponenti fl-ordni li ġejja: l-estratt tal-hmira, it-trittonju, il-glukosju u fl-ahħar, it-trab tal-halib xkumat, fl-ilma. Meta s-sospensjoni tissahħan il-proċedura tkun assistita. Żid l-agar u saħħan għat-togħlija, waqt li thawwad kontinwament sakemm l-agar hu kompletament mahlul, jew fawwar għal madwar 30 minuta.

Iffiltra minn karta tal-filtru, jekk neċessarju.

Ikkontrolla l-pH b'*pH meter* (4.1.4) u jekk neċessarju aġġusta l-pH sabiex, wara l-isterilizzazzjoni huwa $6,9 \pm 0,1$ ma' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bl-użu ta' soluzzjoni (mill-inqas $0,1\text{ mol/1}$) ta' l-idrossidu tas-sodju jew ta' l-aċidu ta' l-idrokloriku.

5.2. *Id-distribuzzjoni, l-isterilizzazzjoni u l-ħażna tal-medium tal-kultura.*

Ferra l-medium (5.1) fi kwantitajiet ta' 100 sa 150 ml f'kunjetti jew 12 sa 15-il ml ftubi (4.2.2). Aghlaq il-kunjetti u t-tubi.

Sterilizza fl-awtoklavi (4.1.2) b' $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal 15-il minuta.

Ikkontrolla l-pH tal-medium.

Jekk il-medium m'għandux jintuza immedjatament, ahžen fid-dlam f'temperatura bejn il-1 u l- $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal mhux iktar minn xahar wara l-preparazzjoni.

5.3. *Medium ta' kultura kummerċjali deidratat*

Il-medium tal-kultura (5.1) jista' jiġi ppreparat minn medium deidratat kummerċjali. Segwi l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant imma žid it-trab tal-halib xkumat qabel ma tholl jekk mhuwiex komponent.

Aġġusta l-pH għal $6,9 \pm 0,1$ f' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ kif deskritt f'5.1 u ferra, sterilizza u ahžen il-medium kif deskritt f'5.2.

6. **Id-dilwenti**

6.1. *Soluzzjoni peptone/salina*

Il-kompożizzjoni:

Peptone:	1,0 g
Klorur tas-sodju (NaCl)	8,5 g
Ilma	1 000 ml

Il-preparazzjoni:

Holl il-komponenti fl-ilma, billi ssahħan jekk neċessarju.

Ikkontrolla l-pH b'*pH meter* (4.1.4) u jekk neċessarju aġġusta l-pH sabiex, wara l-isterilizzazzjoni huwa $7,0 \pm 0,1$ ma' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bl-użu ta' soluzzjoni (mill-inqas $0,1\text{ mol/1}$) ta' l-idrossidu tas-sodju jew ta' l-aċidu idrokloriku.

- 6.2. *Id-distribuzzjoni, l-isterilizzazzjoni u l-ħażna tad-dilwent*
- Ferra d-dilwent (6.1) f'*test tubes* (4.2.1) fi kwantitajiet b'tali mod illi wara l-isterilizzazzjoni kull tubu jikkontjeni $9,0 \pm 0,2$ ml tad-dilwent. Aghlaq it-tubi.
- Sterilizza fl-awtoklavi (4.1.2) b' 121 ± 1 °C għal 15-il minuta.
- Ikkontrolla l-pH tad-dilwent.
- Jekk id-dilwent m'għandux jintuża immedjatament, aħżen fid-dlam f'temperatura bejn il-1 u l- 5 °C għal mhux iktar minn xahar wara l-preparazzjoni.
- 6.3. *Dilwenti kummerċjali deidratati*
- Id-dilwent (6.1) jista' jiġi ppreparat minn *tablets* jew trab deidratati kummerċjali Segwi l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant Aġġusta l-pH kif deskritt f'6.1 u ferra, sterilizza u aħżen id-dilwenti kif deskritt f'6.2.
7. **Il-proċedura**
- 7.1. *It-tidwib tal-medium*
- Qabel ma jibda l-eżami mikrobijoloġiku, dewweb l-ammont meħtieġ tal-*medium* malajr u ttempra l-*medium* għal 45 ± 1 °C f'banju ta' l-ilma (4.1.5).
- 7.2. *Il-preparazzjoni tal-kampjun tal-ħalib*
- Hallat il-kampjun tal-ħalib sewwa, sabiex il-mikro-organizmi huma ddistribwiti b'mod unit kemm jista' jkun, billi taqleb il-kontenitur tal-kampjun tal-ħalib malajr għal 25 darba. Ir-ragħwa għandha tiġi evitata jew tit-halla tixtered. L-intervall bejn it-tahlit u t-tneħħija tal-porzjon tat-test m'għandux jeċċedi t-tliet minuti.
- 7.3. *Il-preparazzjoni tad-dilwizzjoni primarja (10^{-1}) (ħalib mhux ipproċessat u ħalib ippasturizzat)*
- Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1 ml tal-kampjun (7.2) tal-ħalib mhux ipproċessat jew tal-ħalib pasturizzat f'9ml tad-dilwent (6.1) billi tevita kuntatt bejn il-pipetta u d-dilwent. It-temperatura tad-dilwent għandha tkun bejn wiehed u iehor l-istess bħal dik tal-kampjun tal-ħalib. Hallat din id-dilwizzjoni primarja b'attenzjoni fil-*mixer* (4.1.9) għal 5-10 sekondi.
- B'hekk tkun ottenuta dilwizzjoni primarja ta' 10^{-1} .
- 7.4. *Il-preparazzjoni ta' iktar dilwizzjonijiet deċimali (ħalib mhux ipproċessat u ħalib pasturizzat)*
- Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1ml tad-dilwizzjoni primarja (7.3) f' 9ml tad-dilwent (6.1) billi ssegwi l-istruzzjonijiet mogħtija f'7.3.
- Id-dilwizzjoni 10^{-3} hija b'hekk ottenuta.
- Irrepeti dawn l-operazzjonijiet biex jiġu ottenuti iktar dilwizzjonijiet deċimali sakemm in-numru approprjat ta' mikroorganizmi hu mistenni li jiġi ottenut (8.1.1).
- 7.5. *It-tilqim tal-kontenituri Petri*
- 7.5.1. **Halib mhux ippasturizzat:** Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1 ml tal-kampjun u/jew id-dilwizzjoni approprjata deċimali f'kontenitur (4.2.4) Mill-inqas żewġ dilwizzjonijiet għandhom jiġu eżaminati Ipprepara kontenitur wiehed minn kull dilwizzjoni magħżula kif approprjat (8.1.1).
- 7.5.2. **Halib pasturizzat:** Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1 ml tal-kampjun u/jew id-dilwizzjoni approprjata deċimali f'kontenitur (4.2.4) Mill-inqas żewġ dilwizzjonijiet għandhom jiġu eżaminati Ipprepara żewġ kontenituri minn kull dilwizzjoni magħżula kif approprjat (8.1.1).
- 7.5.3. **Halib trattat b'UHT u ħalib sterilizzat** (eżaminat wara inkubazzjoni għal 15-il gurnata bi 30 °C – l-Anness A tad-Direttiva, il-Kapitolu VII, il-punt 5):
- Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 0,1 ml tal-kampjun tal-ħalib (7.2) f'kontenitur (4.2.4) Ipprepara żewġ kontenituri.

7.6. *It-tferrigh*

Ferra' madwar 15 sa 18-il ml tal-medja (7.1) f'kull kontenitur imlaqqam.

Hallat immedjatament wara t-tferrigh billi ddawwar il-kontenitur Petri biżżejjed biex tottjeni kolonji mxerrda b'mod unit wara l-inkubazzjoni.

Il-hin bejn l-aħhar tal-preparazzjoni tal-kampjun tal-halib u t-tahlit, skond it-tip tal-halib, il-porzjon tat-test jew id-dilwizzjoni mal-*medium* m'għandux jeċċedi 15-il minuta.

Hallih jagħqad fuq superfiċi nadif, kiesaħ orizzontali.

7.7. *L-inkubazzjoni tal-kontenituri Petri*

Ittrasferixxi l-kontenituri għall-inkubatur (4.1.3) Il-kontenituri fl-inkubatur għandhom ikunu rashom 'l isfel. Tgħabbix iktar minn sitta fuq xulxin. Il-lottijiet tal-kontenituri għandhom ikunu separati minn xulxin u mill-ħitan u mis-saqaf ta' l-inkubatur.

Inkubahom bi 30 ± 1 ° C għal 72 ± 2 siegħa.

7.8. *L-għadd tal-kolonji*

Għodd il-kolonji fil-kontenituri Petri li ma jikkontjenux iktar minn 300 kolonja.

Eżamina l-kontenituri f'dawl baxx. Biex tiffaċilita l-għadd, jistgħu jintużaw lenti addattati (4.1.6) u/jew kontatur tat-talja (4.1.8). Evita li partikulati ta' materja preċipitata fil-kontenituri jġigu interpretati bhala kolonji *pinpoint*. Eżamina oġġetti dubjużi b'attenzjoni, bl-użu ta' lenti ta' tkabbir oghla (4.1.7) meta meħtieġ, biex tidistingwi oġġetti minn materja barranija.

Kolonji li jixterdu huma kkunsidrati bhala kolonji singoli. Jekk inqas minn kwart tal-kontenitur hu meħud minn kolonji li jixterdu, għodd il-kolonji fil-parti mhux affettwata tal-kontenitur u kkalkula n-numru korrispondenti għall-kontenitur shiħ. Jekk iktar minn kwart tal-kontenitur hu meħud minn kolonji li jixterdu, armi l-kontenitur.

8. **Il-kalkolu u l-espressjoni tar-riżultati**8.1. *Halib mhux ipproċessat u halib pasturizzat*

8.1.1. Uża l-għadd mill-kontenituri kollha li jikkontjenu bejn 10 u 300 kolonja (ara 8.1.3 u 8.1.4).

8.1.2. In-numru ta' mikro-organizmi għal kull 1ml ta' halib mhux ipproċessat jew halib pasturizzat hu mogħti bil-formula:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

fejn:

$\sum C$ hija t-total tal-kolonji kkuntjati f'8.1.1,

$(n_1 + 0,1n_2)d$ hija ekwivalenti għall-volum tal-kampjun plated fejn:

n_1 huwa n-numru ta' kontenituri magħduda fl-ewwel dilwizzjoni,

n_2 huwa n-numru ta' kontenituri magħduda fit-tieni dilwizzjoni,

d huwa l-fattur ta' dilwizzjoni li minnu l-ewwel għadd kien ottenut.

L-għadd jingħata lil żewġ figuri sinifikanti. Meta n-numru li għandu iġi arrotondat huwa 5, arrotonda sabiex il-figura fuq ix-xellug immedjat hija biż-żewġ.

Eżempju (halib pasturizzat):

Id-dilwizzjoni 10^{-2} : 278 u 290 kolonja

d-dilwizzjoni 10^{-3} : 33 u 28 kolonja

$$\begin{aligned} \text{Numru/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4 \end{aligned}$$

- 8.1.3. Jekk hemm biss għadd inqas minn 10, irrapporta n-numru ta' mikro-organizmi għal kull millilitru bhala "inqas minn 10 x d għal kull ml", u "d" jkun ir-reċiproku tal-fattur tad-dilwizzjoni l-iktar baxx.
- 8.1.4. Jekk hemm biss għadd li jeċċedi 300 kolonja imma l-għadd hu possibbli, kkalkula għadd stmat u mmultiplika bir-reċiproku tal-fattur tad-dilwizzjoni. Irrapporta r-riżultat bhala "Numru stmat ta' mikro-organizmi għal kull ml".
- 8.2. *Halib ta' UHT u halib sterilizzat*
- Għadd ta' *plates* ta' iktar minn 10 kolonji b'0,1 ml għandu jigi kkunsidrat li ma jissodisfax iktar il-htigiet fid-Direttiva 85/397/KEE.

9. **Il-precizjoni**

Riżultati minn provi kollaborattivi aċċettati internazzjonalment għad mhumiex disponibbli.

V. **L-ENUMERAZZJONI TA' MIKRO-ORGANIŻMI — IT-TEST TAL-KONT TAL-PLATES B' 21 °C**

1. **L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni**

Din il-proċedura tispeċifika l-proċedura ta' referenza għall-enumerazzjoni ta' mikro-organismi permezz ta' teknika ta' għadd ta' kolonji b' 21 °C fuq ħalib pasturizzat wara l-inkubazzjoni tal-ħalib b' 6 °C għal hamest ijiem biex jiġi ddeterminat il-grad ta' kontaminazzjoni tal-ħalib pasturizzat b'mikro-organismi psikotropiċi kapaċi li jimmultiplikaw fil-ħalib b' 6 °C.

2. **It-tifsira**

In-nominazzjoni "mikro-organismi" tfisser: organismi li jiffurmaw kolonji kontabili meta inkubati ajrubikament taht il-kondizzjonijiet deskritti.

3. **Il-prinċipju**

Il-ħalib pasturizzat hu inkubat b' 6 °C għal hamest ijiem. Volum definit tal-kampjun tal-ħalib hu mħallat mal-medja ta' kultura f'kontenituri Petri u inkubat f' 21 °C għal 25 siegħa. Il-kolonji jitgħaddu u n-numru ta' mikro-organismi għal kull 1ml ta' ħalib pasturizzat hu kkalkulat.

4. **Apparat u affarijiet tal-ħgieg**

It-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u, b'mod partikolari:

4.1. *L-apparat*

4.1.1. Forn ta' l-arja shuna, kapaċi li jopera f' 170 sa 175 °C.

4.1.2. Awtoklavi, kapaċi li jopera f' 121 ± 1 °C.

4.1.3. Inkubaturi, kapaċi li jmantnu temperatura ta'

(a) 6 ± 0,2 °C

(b) 21 ± 1 °C

fil-punti kollha fihom.

4.1.4. pH meter, b'kumpens ta' temperatura, eżatt sa unità + 0,1 pH.

4.1.5. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jopera f' 45 ± 1 °C.

4.1.6. Lenti, tkabbir 2 – 4x.

4.1.7. Lenti, tkabbir 8 – 10x.

4.1.8. Il-kontatur tat-talja.

4.1.9. Mixer kapaċi jhallat 1 ml tal-kampjun ta-ħalib jew dilwizzjoni decimali ma' 9ml dilwent u li jahdem fuq il-prinċipju ta' rotazzjoni eċċentrika tal-kontenut tat-test tube.

4.2. *Affarijiet tal-ħgieg*

4.2.1. Test tubes b'għeluq xieraq u b'kapaċità biżżejjed biex jikkontjenu, bi spazju fuq biżżejjed għat-tahlit, 10 ml tad-dilwizzjoni primarja jew dilwizzjonijiet decimali oħrajn.

4.2.2. Fliexken, ta' kapaċità ta' 150 sa 250 ml jew tubi, madwar 20ml kapaċità, biex iżommu l-medja tal-kultura.

4.2.3. Pipetti (miżduda bit-tajjar) tal-ħgieg jew ta' materjal sterili sintetiku b'ponta mhux miksur ta' kapaċità nominali ta' 1ml u li jkollhom fetha ta' dijametru 1,75 sa 3 mm.

4.2.4. Kontenituri Petri, ta' ħgieg ċar mhux ikkullurit jew materjal sterili sintetiku, bil-kontenitur fil-qiegħ li jkollu dijametru intern ta' madwar 90 – 100 mm. Il-fond intern għandu jkun ta' minimu ta' 10 mm. Il-qiegħ ma għandu jkollu ebda irregolarità li tithallat mal-kolonji ta' l-ikkuntjar.

4.2.5. *L-Isterilizzazzjoni ta' l-affarijiet tal-ħgieg*

L-affarijiet tal-ħgieg għandhom ikunu sterilizzati b'wahda mill-proċeduri li ġejjin:

(a) billi jinżammu f'170 sa 175 °C għal mhux inqas minn siegħa f'forn ta' l-arja shuna (4.1.1);

(b) billi jinżammu f'121 + 1 °C għal mhux inqas minn 20 minuta f'awtoklavi (4.1.2).

Fl-awtoklavi għandu jkun hemm attenzjoni biex tiġi assigurata penetrazzjoni adegwata ta' fwar — eż. jekk it-tagħmir hu sterilizzat f'kontenituri, dawn m'għandhomx ikunu magħluqin issikkati, il-fliexken għandu jkollhom ghotjien mahlula.

Affarijiet tal-ħġieġ sterilizzati fl-awtoklavi għandhom jitnixxfu billi jiġi ventilat il-fwar.

Il-pipetti għandhom jiġu sterilizzati f'forn bl-arja shuna (4.1.1).

5. **Il-medja ta' kultura – il-kont tal-plates tal-halib agar**

5.1. *Il-kompożizzjoni:*

Estratt tal-ħmira	2.5 g
Trittonju	5.0 g
Glukosju D(+) jew id- <i>dextrose</i>	1.0 g
Trab tal-halib xkumat	1.0 g
<i>Agar</i>	10 sa 15-il g jiddependi fuq il-karatteristiċi ta' tagħqid ta' l- <i>agar</i> użat
Ilma	1 000 ml

It-trab tal-halib xkumat għandu jkun hieles minn sustanzi inibitorji. Dan għandu jiġi vverifikat b'testijiet komparattivi bl-użu ta' trab tal-halib xkumat magħruf li jkun hieles minn sustanzi inibitorji.

Il-preparazzjoni:

Issospendi u dewweb il-komponenti fl-ordni li ġejja: l-estratt tal-ħmira, it-trittonju, il-glukosju u fl-aħħar, it-trab tal-halib xkumat, fl-ilma. Meta s-sospensjoni tissahhan il-proċedura tkun assistita. Żid l-*agar* u saħhan għat-toghlija, waqt li thawwad kontinwament sakemm l-*agar* hu kompletament imdewweb, jew fawwar għal madwar 30 minuta.

Iffiltra minn karta tal-filtru, jekk neċessarju.

Ikkontrolla l-pH b'metru tal-pH (4.1.4) u jekk neċessarju aġġusta l-pH sabiex, wara l-isterilizzazzjoni huwa 6.9 ± 0.1 ma' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bl-użu ta' soluzzjoni (mill-inqas 0.1 mol/l) ta' l-idrossidu tas-sodju jew ta' l-aċidu idrokloriku.

5.2. *Id-distribuzzjoni, l-isterilizzazzjoni u l-ħażna tal-medja tal-kultura.*

Ferra l-medja (5.1) fi kwantitajiet ta' 100 sa 150 ml fi fliexken jew 12 sa 15-il ml ftubi (4.2.2). Aghlaq il-fliexken u t-tubi.

Sterilizza fl-awtoklavi (4.1.2) b' $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal 15-il minuta.

Ikkontrolla l-pH tal-medja.

Jekk il-medja m'għandhiex tintuża immedjatament, aħzinha fid-dlam f'temperatura bejn il-1 u l- $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal mhux iktar minn xahar wara l-preparazzjoni.

5.3. *Medja ta' kultura deidrata kummerċjali*

Il-medja tal-kultura (5.1) tista' tiġi ppreparata minn medja deidratata kummerċjali. Segwi l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant imma żid it-trab tal-halib xkumat qabel ma ddewweb jekk mhuwiex komponent.

Aġġusta l-pH għal 6.9 ± 0.1 f' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ kif deskritt f'5.1 u ferra' sterilizza u aħzen il-medja kif deskritt f'5.2.

6. **Id-Dilwenti**

6.1. *Is-soluzzjoni Peptone/salina:*

Kompożizzjoni:

Peptone	1.0 g
Klorur tas-sodju (NaCl)	8.5 g
Ilma	1 000 ml

Il-preparazzjoni:

Dewweb il-komponenti fl-ilma, billi ssahhan jekk neċessarju.

Ikkontrolla l-pH b'metru tal-pH (4.1.4) u jekk neċessarju aġġusta l-pH sabiex, wara l-isterilizzazzjoni huwa 7.0 ± 0.1 ma' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bl-użu ta' soluzzjoni (mill-inqas 0.1 mol/l) ta' l-idrossidu tas-sodju jew ta' l-aċidu idrokloriku.

6.2. **Id-distribuzzjoni, l-isterilizzazzjoni u l-hażna tad-dilwent**

Ferra d-dilwent (6.1) f'test tubes (4.2.1) fi kwantitajiet b'tali mod illi wara l-isterilizzazzjoni kull tubu jikkontjeni $9,0 \pm 0,2$ ml tad-dilwent. Aghlaq it-tubi.

Sterilizza fl-awtoklavi (4.1.2) b' 121 ± 1 °C għal 15-il minuta. Ikkontrolla l-pH tad-dilwent.

Jekk il-medja m'għandhiex tintuża immedjatament, aħzinha fid-dlam f'temperatura bejn il-1 u l-5 °C għal mhux iktar minn xahar wara l-preparazzjoni.

6.3. *Dilwenti deidрати kummerċjali*

Id-dilwent (6.1) jista' jiġi ppreparat minn *tablets* jew trab deidratati kummerċjali. Segwi l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant. Aġġusta l-pH kif deskritt f'6.1 u ferra, sterilizza u aħzen id-dilwenti kif deskritt f'6.2.

7. **Il-proċedura**

7.1. *It-tidwib tal-medja*

Qabel ma jibda l-eżami mikrobijologiku, dewweb l-ammont meħtieġ tal-medja malajr u ttempra l-medja għal 45 ± 1 °C f'banju ta' l-ilma (4.1.5).

7.2. *Il-preparazzjoni tal-kampjun tal-halib*

7.2.1. Inkuba pakkett mhux miftuh ta' halib pasturizzat, jew jekk dan hu impossibbli kampjun rappreżentattiv mhux inqas minn 100 ml għal 120 siegħa \pm 2 sigħat f' $6 \pm 0,5$ °C f'inkubatur (4.1.3(a)).

7.2.2. Wara l-inkubazzjoni hallat il-kampjun tal-halib sewwa, sabiex il-mikro-organizmi huma ddistribwiti b'mod unit kemm jista' jkun, billi taqleb il-kontenitur tal-kampjun tal-halib malajr għal 25 darba. Ir-ragħwa għandha tġi evitata jew tithalla tixtered. L-intervall bejn it-tahlit u t-tneħħija tal-porzjon tat-test m'għandux jeċċedi t-tliet minuti.

7.3. *Il-preparazzjoni tad-dilwizzjoni primarja (10^{-1})*

Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1 ml tal-kampjun (7.2.2) f'9ml tad-dilwent (6.1) billi tevita kuntatt bejn il-pipetta u d-dilwent. It-temperatura tad-dilwent għandha tkun bejn wiehed u iehor l-istess bħal dik tal-kampjun tal-halib. Hallat din id-dilwizzjoni primarja b'attenzjoni bl-użu ta' *mixer* (4.1.9) għal 5 sa 10 sekondi.

B'hekk tkun ottenuta dilwizzjoni primarja ta' 10^{-1} .

7.4. *Il-preparazzjoni ta' dilwizzjonijiet decimali oħrajn*

Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1ml tad-dilwizzjoni primarja (7.3) f'9ml tad-dilwent (6.1) billi ssegwi l-istruzzjonijiet mogħtija f'7.3.

Id-dilwizzjoni 10^{-3} hija b'hekk ottenuta.

Irrepeti dawn l-operazzjonijiet biex jiġu ottenuti iktar dilwizzjonijiet decimali sakemm in-numru approprijat ta' mikro-organizmi hu mistenni li jiġi ottenut (8.1).

7.5. *It-tilqim tal-kontenituri Petri*

Ittrasferixxi b'pipetta sterili (4.2.3) 1 ml tal-kampjun u/jew id-dilwizzjoni decimali approprijata f'kontenitur (4.2.4) Mill-inqas żewġ dilwizzjonijiet għandhom jiġu eżaminati l-prepara żewġ kontenituri minn kull dilwizzjoni magħżula kif approprijat (8.1).

7.6. *It-tferrigh*

Ferra madwar 15 sa 18-il ml tal-medja (7.1) f'kull kontenitur mogħti t-tilqima.

Hallat immedjatament wara t-tferrigh billi ddawwar il-kontenitur Petri biżżejjed biex tottjeni kolonji mxerrda b'mod unit wara l-inkubazzjoni.

Il-hin bejn l-aħħar tal-preparazzjoni tal-kampjun tal-halib u t-tahlit tad-dilwizzjoni mal-medja m'għandux jeċċedi 15-il minuta.

Hallih jagħqad fuq wiċċ nadif, kiesaħ orizzontali.

7.7. *L-inkubazzjoni tal-kontenituri Petri*

Ittrasferixxi l-kontenituri għall-inkubatur (4.1.3(b)). Il-kontenituri fl-inkubatur għandhom ikunu rashom 'l isfel. Tgħabbix iktar minn sitta fuq xulxin. Il-lottijiet tal-kontenituri għandhom ikunu separati minn xulxin u mill-hitin u mis-saqaf ta' l-inkubatur.

Inkubahom $f21 \pm 1$ °C għal 25 siegħa.

7.8. *L-ikkuntjar tal-kolonji*

Għodd il-kolonji fil-kontenituri Petri li ma jikkontjenux iktar minn 300 kolonja.

Eżamina l-kontenituri f'dawl baxx. Biex tiffacilita l-ikkuntjar, jistgħu jintużaw lenti adattati (4.1.6) u/jew kuntatur tat-talja (4.1.8). Evita li partikulati ta' materja preċipitata fil-kontenituri jiġu interpretati bhala kolonji *pinpoint*. Eżamina oġġetti dubjużi b'attenzjoni, bl-użu ta' lenti ta' ingradiment effettiv oghla (4.1.7) meta meħtieġ, biex tiddistingwi oġġetti minn materja barranija.

Kolonji li jixterru huma kkunsidrati bhala kolonji singoli. Jekk inqas minn kwart tal-kontenitur hu meħud minn kolonji li jixterru, għodd il-kolonji fil-parti mhux affettwata tal-kontenitur u kkalkula n-numru korrispondenti għall-kontenitur shih. Jekk iktar minn kwart tal-kontenitur hu meħud minn kolonji li jixterru, arni l-kontenitur.

8. **Il-kalkolu u l-espressjoni tar-riżultati**

8.1. Uża l-għadd mill-kontenituri kollha li jikkontjenu bejn 10 u 300 kolonja (ara 8.3 u 8.4).

8.2. In-numru ta' mikro-organizmi għal kull 1 ml ta' halib pasturizzat hu mogħti bil-formula:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

fejn

$\sum C$ huwa t-total tal-kolonji magħduda bħal f' 8.1,

$(n_1 + 0,1n_2)d$ huwa ekwivalenti għall-volum tal-kampjun *plated* fejn:

n_1 huwa n-numru ta' kontenituri magħduda fl-ewwel dilwizzjoni,

n_2 huwa n-numru ta' kontenituri magħduda fit-tieni dilwizzjoni,

d huwa l-fattur ta' dilwizzjoni li minnu l-ewwel għadd kien ottenut.

L-għadd jingħata lil żewġ figuri sinifikanti. Meta n-numru li għandu jiġi arrotondat huwa 5, arrotonda sabiex il-figura fuq ix-xellug immedjat hija biż-żewġ.

Eżempju:

Id-dilwizzjoni 10^{-2} : 278 u 290 kolonja

Id-dilwizzjoni 10^{-3} : 33 u 28 kolonja

$$\begin{aligned} \text{Numru/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4 \end{aligned}$$

8.3. Jekk hemm biss għadd inqas minn 10, irrapporta n-numru ta' mikro-organizmi għal kull millilitru bhala "inqas minn $10 \times d$ għal kull ml"; u "d" jkun ir-riċiproku tal-fattur tad-dilwizzjoni l-iktar baxx.

8.4. Jekk hemm biss għadd li jeċċedi 300 kolonja imma l-għadd hu possibbli, ikkalkula għadd smat u mmultiplika bir-riċiproku tal-fattur tad-dilwizzjoni. Irrapporta r-riżultat bhala "Numru smat ta' mikro-organizmi għal kull ml".

9. **Il-precizjoni**

Riżultati minn provi kollaborattivi aċċettati internazzjonalment għad mhumiex disponibbli.

VI. ENUMERAZZJONI TAL-KOLIFORMI — L-GHADD TAL-KOLONJI BI 30 °C

1. **L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni**

Din il-proċedura tispesifika l-proċedura ta' referenza għall-enumerazzjoni ta' koliformi f'halib pasturizzat permezz ta' teknika ta' għadd tal-kolonji bi 30 °C.

2. **It-tifsira**

In-nomina "koliformi" tfisser batterji li ma' 30 °C tiffirma kolonji karatteristiċi jew kolonji mhux karatteristiċi li jiffermentaw il-lattosju bil-produzzjoni tal-gass taht il-kondizzjonijiet deskritti.

3. **Il-prinċipju**

Volum definit tal-kampjun tal-halib hu mhallat mal-*medium* ta' kultura f' kontenituri Petri u inkubat fi 30 °C għal 24 siegħa. Kolonji karatteristiċi huma magħduda u jekk neċessarju l-identità ta' kolonji mhux karatteristiċi hija kkonfermata b'eżami għall-abbiltà li jiffermentaw il-lattosju. In-numru ta' koliformi għal kull 1ml ta' halib pasturizzat huwa mbağħad ikkalkulat.

4. **Apparat u affarijiet tal-ħgieg**

It-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u, b'mod partikolari:

4.1. *L-apparat*

4.1.1. Forn ta' l-arja sħuna, kapaċi li jopera f'170 sa 175 °C.

4.1.2. Awtoklavi, kapaċi li jopera f' 121 ± 1 °C.

4.1.3. Inkubatur, kapaċi li jżomm temperatura ta' 30 ± 1 °C fil-punti kollha fih.

4.1.4. pH-meter, b'kumpens ta' temperatura, eżatt sa unità + 0,1 pH.

4.1.5. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jopera f'45 ± 1 °C.

4.1.6. Labra tal-wajer magħmula mill-platinum-iridium jew minn nikel-kromju.

4.2. *Affarijiet tal-ħgieg*

4.2.1. Test tubes b'għeluq xieraq u ta' kapaċità ta' 20 ml, biex iżommu l-*medium* konformatorju (5.2) u tubi Durham ta' dimensjonijiet approprijati għall-użu mat-test tubes.

4.2.2. Kunjetti ta' kapaċità 150 sa 250 ml biex iżommu l-*medium* solidu selettiv (5.1).

4.2.3. Pipetti (miżduda bit-tajjar) tal-ħgieg jew ta' materjal sterili sintetiku b'ponta mhux miksura ta' kapaċità nominali ta' 1-10 ml u li jkollhom fetha ta' dijametru 1,75 sa 3 mm.

4.2.4. Kontenituri Petri, ta' ħgieg ċar mhux ikkullurit jew materjal sterili sintetiku, bil-kontenitur fil-qiegħ li jkollu dijametru intern ta' madwar 90-100 mm. Il-fond intern għandu jkun ta' minimu ta' 10 mm. Il-qiegħ ma għandu jkollu ebda irregolarità li tithallat mal-kolonji ta' l-għadd.

4.2.5. L-Isterilizzazzjoni ta' l-affarijiet tal-ħgieg:

L-Affarijiet tal-ħgieg għandhom ikunu sterilizzati b'waħda mill-proċeduri li ġejjin:

(a) billi jinżammu f'170 sa 175 °C għal mhux inqas minn siegħa f'forn ta' l-arja sħuna (4.1.1);

(b) billi jinżammu f'121 ± 1 °C għal mhux inqas minn 20 minuta f'awtoklavi (4.1.2).

Fl-awtoklavi għandu jkun hemm attenzjoni biex tiġi assigurata penetrazzjoni adegwata ta' fwar – eż. jekk it-tagħmir hu sterilizzat f'kontenituri, dawn m'għandhomx ikunu magħluqin issikkati, il-fliexken għandu jkollhom ghotjien mahlula.

Affarijiet tal-ħgieg sterilizzati fl-awtoklavi għandhom jitnixxfu billi jiġi ventilat il-fwar.

Il-pipetti għandhom jiġu sterilizzati f'forn bl-arja sħuna (4.1.1).

5. Il-Medium tal-Kultura

5.1. Agar lattosju ta' bili vjola ħomor (Agar LBVH) Medium solidu selettiv

Kompożizzjoni:

Peptone	7 g
Estratt tal-ħmira	3 g
Lattosju (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O)	10 g
Klorur tas-sodju (NaCl)	5 g
Melħ tal-bili	1,5 g
Aħmar newtrali	0,03 g
Vjola kristall	0,002 g
Agar	10 sa 15 g (jiddependi fuq il-karatteristiċi ta' tagħqid ta' l-agar użat)
Ilma	1 000 ml

Il-preparazzjoni:

Issospendi u holl il-komponenti fl-ilma u hallihom joqogħdu għal diversi minuti, imbagħad hallat vigorozament.

Ikkontrolla l-pH b'*pH-meter* (4.1.4) u jekk neċessarju aġġusta l-pH sabiex, wara t-togħlija, huwa $7.4 \pm 0,1$ ma' 25 °C bl-użu ta' soluzzjoni (mill-inqas 0,1 mol/l) ta' l-idrossidu tas-sodju jew ta' l-aċidu idrokloriku.

Ġib malajr għat-togħlija, u dawwar minn żmien għal żmien u ferra' immedjatament fi kwantitajiet ta' 100 sa 150 ml f' kunjetti sterili (4.2.2). Ittempra l-medium f'banju ta' l-ilma (4.1.5) b' 45 ± 1 °C

L-isterilità tal-medium għandha tiġi kkontrollata fil-hin ta' l-użu (ara 6.4).

Uża l-medium fi żmien tliet sigħat mill-preparazzjoni tiegħu.

5.2. Brodu ta' bili tal-lattosju aħdar jghajjat. Medium ta' Konferma.

Kompożizzjoni:

Peptone	10 g
Lattosju (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O)	10 g
Bili deidrati tal-gendus	20 g
Aħdar jghajjat	0,0133 g
Ilma	1 000 ml

Il-preparazzjoni:

Holl il-komponenti fl-ilma billi tghalli.

Ikkontrolla l-pH b'metru tal-pH (4.1.4) u jekk neċessarju aġġusta l-pH sabiex, wara l-isterilizzazzjoni huwa $7.2 \pm 0,1$ ma' 25 °C bl-użu ta' soluzzjoni (mill-inqas 0,1 mol/l) ta' l-idrossidu tas-sodju jew ta' l-aċidu idrokloriku.

Ferra' l-medium, fi kwantitajiet ta' 10 ml, f' *test tubes* (4.2.1) li jikkontjenu tubi Durham. Aghlaq it-tubi.

Sterilizza fl-awtoklavi (4.1.2) b' 121 ± 1 °C għal 15-il minuta.

It-tubi Durham m'għandhomx jikkontjenu bzieżaq ta' l-arja wara l-isterilizzazzjoni.

Ikkontrolla l-pH tal-medja.

Jekk il-medium m'għandux jintuża immedjatament, aħżnu fid-dlam f'temperatura bejn iż-0 u l- 5 °C għal mhux iktar minn xahar wara l-preparazzjoni.

5.3. Medium ta' kultura deidrat kummerċjali

Il-medium tal-kultura (5.1) jista' jiġi ppreparat minn medium deidratat kummerċjali. Segwi l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant. Aġġusta l-pH u ferra', għalli jew sterilizza u aħżen il-medium kif deskritt f' 5.1 u 5.2.

6. Il-proċedura

6.1. Il-medium

Uża l-medium (agar VRBL) kif deskritt f' 5.1.

6.2. *Il-preparazzjoni tal-kampjun tal-halib*

Hallat il-kampjun tal-halib sewwa, sabiex il-mikro-organizmi huma ddistribwiti b'mod unit kemm jista' jkun, billi taqleb il-kontenitur tal-kampjun tal-halib malajr għal 25 darba. Ir-ragħwa għandha tgi evitata jew tit-halla tixtered. L-intervall bejn it-tahlit u t-tnehhija tal-porzjon tat-test m'għandux jeċċedi t-tliet minuti.

6.3. *It-tilqim tal-kontenituri Petri*

3 ml tal-kampjun tal-halib (6.2) huma mlaqqma billi jiġi trasferit b'pipetta sterili (4.2.3) 1 ml tal-kampjun tal-halib f'kull wiehed mit-tliet kontenituri (4.2.4)

6.4. *It-tferrigh*

Ferra agar VRBL (6.1) f'kull kontenitur imlaqqam fi kwantitajiet ta' madwar 12-il ml.

Hallat immedjatament wara t-tferrigh billi ddawwar il-kontenitur Petri biżżejjed biex tottjeni kolonji mxerreda b'mod unit wara l-inkubazzjoni.

Il-hin bejn l-aħħar tal-preparazzjoni tal-kampjun tal-halib u t-tahlit tad-dilwizzjoni mal-medja m'għandux jeċċedi 15-il minuta.

Ipprepara għal skopijiet ta' sterilità bhala kontroll kontenitur mhux imlaqqam, b'12-il ml ta' l-agar VRBL użat għall-kontenituri mlaqqma.

Hallih jagħqad fuq superfiċi nadif kiesah sakemm il-medium ikun qagħad.

Wara solidifikazzjoni kompleta ferra' mill-inqas 4 ml agar VRBL (6.1) fuq is-superfiċi tal-medium imlaqqam.

Hallih jagħqad.

6.5. *L-inkubazzjoni tal-kontenituri Petri*

Ittrasferixxi l-kontenituri għall-inkubatur (4.1.3) Il-kontenituri fl-inkubatur għandhom ikunu rashom 'l isfel. Tgħabbix iktar minn sitta fuq xulxin. Il-lottijiet tal-kontenituri għandhom ikunu separati minn xulxin u mill-hitan u mis-saqaf ta' l-inkubatur.

Inkubahom fi 30 ± 1 °C għal 24 ± 2 siegħa.

6.6. *L-għadd tal-kolonji*

6.6.1. Ghodd il-kolonji fil-kontenituri Petri li ma jikkontjenux iktar minn 150 kolonja. Ghodd il-kolonji homor skuri li jkollhom dijametru ta' mill-inqas 0,5 mm bil-materja solida madwar jew mingħajrha, karatteristika għall-koliformi.

6.6.2. Jekk il-kolonji kollha jew ftit minnhom għandhom aspekk mhux karatteristiku (eż. ivarjaw fil-kulur, fid-daqs jew fil-formazzjoni tal-materja solida madwar mill-kolonji tipiċi) wettaq test ta' konferma (6.7).

6.7. *Test ta' konferma*

Skond l-indikazzjonijiet mogħtija f'6.6.2 wettaq test ta' konferma fuq numru xieraq (eż. tlieta sa hamsa) ta' kolonji mhux karatteristiċi permezz ta' tilqim ftubi ta' brodu ta' bili lattosju aħdar jgħajjat (5.2) bl-użu ta' labra tal-wajer (4.1.6). Inkuba t-tubi fi 30 ± 1 °C għal 24 ± 2 siegħa.

Ikkunsidra l-kolonji li jipproduċu gass fit-tubu Durham bhala koliformi konfermati.

7. **Il-Kalkolu u l-espressjoni tar-riżultati**

7.1. Uża għadd (ara 7.4) minn kontenituri li ma jikkontjenux iktar minn 150 kolonja.

7.2. Jekk hu applikat test ta' konferma, ikkalkula n-numru ta' kolonji ta' koliformi mill-perċentwali tal-kolonji ta' koliformi konfermati.

7.3. In-numru ta' koliformi għal kull 1ml ta' halib pasturizzat hu mogħti bil-formula:

$$\frac{\sum C}{n}$$

fejn:

ΣC huwa n-numru totali ta' kolonji ta' koliformi (7.1 inkonnessjoni ma' 7.2) misjuba mill-eżami tal-kampjun tal-halib (3 ml),

N huwa n-numru ta' millilitri tal-kampjun eżaminat (6.3) (3 ml).

L-ghadd hu mogħti lil żewġ figuri sinifikanti meta hemm iktar minn 100 kolonja. Meta n-numru li għandu jiġi arrotondat huwa 5, arrotonda sabiex il-figura fuq ix-xellug immedjat hija biż-żewġ.

Jekk hemm biss għadd li jeċċedi 150 kolonja, irrapporta r-riżultat bħala "Numru stmat ta' koliformi għal kull 1ml".

8. **Il-precizjoni**

Riżultati minn provi kollaborattivi aċċettati internazzjonalment mhumiex disponibbli.

VII. L-ENUMERAZZJONI TA' ĊELLOLI SOMATIĊI

Din il-proċedura tispeċifika żewġ proċeduri bħala proċeduri ta' referenza għall-enumerazzjoni ta' ċelloli somatiċi.

- A. Il-metodu mikroskopiku
- B. Il-metodu fluoro-opto-elettroniku

A. *Il-metodu mikroskopiku*1. **L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni**

Din il-proċedura tispeċifika l-proċedura ta' referenza għall-enumerazzjoni ta' ċelloli somatiċi f'halib mhux ipproċessat.

Din il-proċedura tispeċifika l-proċedura għall-enumerazzjoni tan-numru ta' ċelloli f' kampjun tal-halib biex tiġi kkalibrata u eżaminata l-eżattezza tal-proċedura fluoro-opto elettronika (ara B.1).

2. **It-tifsira**

Għal din il-proċedura ċelloli somatiċi huma dawk iċ-ċelloli, eż. ċelloli *leucocytes* u *epithelial* li n-nuklei tagħhom jistgħu jitttebbgħu b'mod distint bl-użu tal-blu *methylene*.

3. **Il-prinċipju**

0,01 ml tal-halib hu mxerred tul 1 ċm² ta' mejla *Il-film* u mnixxef u mtebbgħa L-Għadd isir bl-użu ta' mikroskopju. In-numru ta' ċelloli somatiċi magħduda f'arja definita hu mmultiplikata bil-fattur operattiv sabiex ikunu ottenuti n-numru ta' ċelloli/ml.

4. **Ir-riagenti**

Kimiċi analitiċi ta' grad għandhom jintużaw.

Is-soluzzjoni taż-żebgħa tal-kulur:

Kompożizzjoni:

Il-Blu <i>methylene</i>	0,6 g
L-Etanol – 99 %	54 ml
1,1,1-trikloroetan jew tetrakloroetan	40 ml
Āċidu āċetiku glaċjali	6 ml

Twissija

It-Tetrakloroetan huwa velenuż. Jekk uzata l-preparazzjoni u l-applikazzjoni għandhom jitwettqu f'*cupboard* tad-duhħan

Il-Preparazzjoni:

Hallat l-etanol u 1,1,1-trikloroetan jew tetrakloroetan fi flixxun u saħħan f'banju ta' l-ilma sa 60 sa 70 °C Żid il-blu *methylene*, hallat b'attenzjoni, kessaħ fi frigg sa 4 °C tul 12 sa 24 siegħa u žid l-āċidu āċetiku glaċjali. Iffiltra, bl-użu ta' filtru b'daq ta' pori ta' 10 sa 12 mikroni jew inqas, u aħžen is-soluzzjoni taż-żebgħa tal-kulur fi flixxun mitbuq jekk huma f'formati partikolati jew sediment, iffiltra darb'ohra qabel l-użu.

5. **L-Apparatu affarijiet tal-ħgieg**

- 5.1. *Mikroskopju*, b'ingradiment effettiv ta' × 500 sa × 1 000.
- 5.2. *Mikrosiringa*, 0,01 ml b'eżattezza ta' ± 2 % jew aħjar.

- 5.3. Mejla, b'arja ta' 20 mm × 5 mm immarkata għall-*film*, jew mejla standard u *template* ta' 20 mm × 5 mm għall-*film*.
- 5.4. *Hot plate* illivellat, (30 sa 50 °C) biex jitnixxfu l-mejliet.
- 5.5. Fann(li jnixxef ix-xagħar), għat-tnixxif tal-*film*.
- 5.6. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jopera b' 30 sa 40 °C biex jissahħan il-kampjun tal-halib.
- 5.7. Mejla mikrometra ta' stadju, irrigata f'divizjonijiet ta' 0,01 mm.

6. Il-proċedura

6.1. Il-kampjun tal-halib

Il-kampjun tal-halib għandu jkun ittestjat fi żmien sitt sigħat minn meta jittiehdu l-kampjuni. Tul il-ħażna it-temperatura tal-kampjun m'għandhiex teċċedi 6 °C L-iffriżar għandu jiġi evitat

6.2. Il-preparazzjoni tal-kampjun fil-laboratorju

Sahħan il-kampjun f'banju ta' l-ilma (5.6) sa 30 sa 40 °C Imbagħad hallat b'attenzjoni. Kessah sat-temperatura li fiha l-mikrosiringa (5.2) giet kalibrata, eż. 20 °C.

6.3. It-trattament minn qabel tal-mejliet

Naddaf il-mejliet (5.3), per eżempju b'etanol, nixxef b'karta hielsa mit-trab, qabbad bi fjamma u kessah. Ahżen f'kaxxa biex tevita t-trab.

6.4. Il-preparazzjoni tal-film

Nehhi 0,01 ml tal-halib mill-kampjun ippreparat bħal fuq bl-użu ta' mikrosiringa (5.2). Naddaf fuq barra tas-siringa f'kuntatt mal-halib b'attenzjoni Qiegħed is-siringa fuq il-mejla (5.3), billi l-ewwel tpingi l-linja ta' barra tal-forma (20 mm x 5 mm). Imbagħad imla l-arja b'mod unit kemm jista jkun. Ixxotta l-*film* fuq *hot plate* illivellat (5.4) sakemm niexef għal kollox.

Għandhom jiġu ppreparati u eżaminati mill-inqas żewġ *films* minn kull kampjun tal-halib.

6.5. It-tizbiġħ bil-kulur tal-films

Bill f'soluzzjoni ta' zebgħa bil-kulur (4) għal 10 minuti Nixxef, u kompli b'fann (5.5) jekk meħtieġ Bill il-*films* filma tal-vit sakemm iż-zebgħa tal-kulur żejda kollha titneħħa. Imbagħad nixxef għal darb'ohra u ahżen waqt li tippoteġi kontra t-trab.

6.6. Il-kalibrazzjoni tal-qasam mikroskopiku

Jiddependi fuq l-ingradiment effettiv magħżul (× 500 sa × 1 000) iddetermina bil-mejla mikrometra ta' l-istadju (5.7) id-dijametru tal-qasam mikroskopiku.

7. L-għadd u l-kalkolu

7.1. L-għadd taċ-ċelloli

Uża mikroskopju (5.1) Minflok tghodd iċ-ċelloli, biss in-nuklei taċ-ċelloli huma magħduda Dawn jintgħarfu b'mod ċar u għall-għadd mill-inqas nofs in-nukleu għandu jidher fil-qasam mikroskopiku Ghodd l-istrixxi jew l-oqsma minn nofs it-terz tal-*film*, evita li tghodd l-istrixxi jew l-oqsma magħżula esklussivament mill-arji periferali tal-*film* Il-preparazzjoni tal-*film* b'attenzjoni, u għalhekk kemm huma ta' minjoqghod fuqhom ir-riżultati, għandhom jiġu kkontrollati mill-inqas darba f'xahar billi jingħaddu l-partijiet differemti tal-*film* L-għadd jista' wkoll jitwettaq billi jingħaddu l-oqsma mikroskopici mxerrda f'sistema sabiex il-partijiet kollha tal-*film* huma rappreżentati b'mod ugwali.

7.2. In-numru minimu taċ-ċelloli li għandhom jingħaddu

Ladarba l-għadd mikroskopiku ta' ċelloli somatiċi jista' wkoll jintuża għall-istandardizzazzjoni ta' proċeduri ta' l-għadd awtomatiċi u mekkanizzati, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni ta' l-għadd fuq kampjuni identiċi m'għandux ikun oġġha minn dak ta' strumenti elettronici. Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni fuq kampjun tal-halib li jikkontjeni 400 000 sa 600 000 ċellola/ml m'għandux jeċċedi 5 %.

In-numru ta' ċelloli somatiċi li għandu jingħadd f'kull kampjun għandu, skond il-karatteristiċi tad-distribuzzjoni Poisson, ikun mill-inqas 400 sabiex jilhaq din ir-rata ta' repetizzjoni.

Id-distribuzzjoni Poisson tippresupponi

$$M = V = s^2,$$

fejn

M huwa l-valur medju

V hija l-varjazzjoni

u

s hija d devjazzjoni standard

Il-koeffiċjent tal-varjazzjoni huwa:

$$CV = \frac{s \times 100 \%}{M} \text{ or } CV = \frac{100 \%}{s} \text{ or } CV = \frac{100 \%}{\sqrt{M}}$$

M (medja) li jindika n numru ta' partikolati (ċelloli) li ngħaddew (i.e. 400 għal $CV = 5 \%$).

7.3. Il-kalkolu tal-fattur operattiv

Bl-użu ta' 0,01ml ta' ħalib il-fattur operattiv hu kkalkulat skond 7.3.1 jew 7.3.2.

7.3.1 L-għadd ta' l-istrixxi tul il-film

It-tul ta' l-istrixxi li għandhom jingħaddu hu ta' 5 mm kull wiehed. Il-wisa' ta' strixxa tikkorrispondi għad-dijametru tal-qasam mikroskopiku kif determinat bl-mejla mikrometra ta' l-istadju (5.7),

$$\text{Współczynnik roboczy} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

fejn:

d huwa d-dijametru tal-qasam mikroskopiku f'mm kif determinat bl-mejla mikrometra ta' l-istadju (5.7)

b huwa n-numru ta' strixxi magħduda kompletament

7.3.2. L-għadd ta' oqsma mikroskopiċi fit-terz tan-nofs tal-film jew bi grilja:

$$\text{Współczynnik roboczy} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\Pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12732}{d^2 \times s}$$

fejn:

d huwa d-dijametru tal-qasam mikroskopiku f'mm kif determinat bl-mejla mikrometra ta' l-istadju (5.7)

s huwa n-numru ta' oqsma magħduda.

7.4. Il-kalkolu tal-kontenut taċ-ċellola

In-numru ta' ċelloli somatiċi magħduda (7.1 u 7.2) hu mmultiplikat bil-Fattur Operattiv (7.3) sabiex ikunu ottenuti ċ- ċelloli għal kull ml ta' ħalib.

7.5. Il-precizzjoni

Il-koeffiċjent tal-varjazzjoni (ara 7.2) m'għandux jeċċedi 5 %.

Riżultati minn provi kollaborattivi aċċettati internazzjonalment mhumiex disponibbli.

B. Il-metodu fluoro-opto-elettroniku

1. L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni

Din il-proċedura tissimplifika l-proċedura ta' referenza, li wara kalibrizzjoni kif suppost (ara A.1), tista' tintuża għall-għadd ta' ċelloli somatiċi f'ħalib mhux ipproċessat – bil-preservazzjoni kimika jew mingħajrha.

2. **It-tifsira**

Għal din il-proċedura ċelloli somatiċi huma partikulati li għandhom intensità minima ta' florexzenza minhabba t-tebġha tad-DNA fin-nukleu taċ-ċelloli somatiċi.

3. **Il-prinċipju**

Parti tal-kampjun (eż. 0,2ml) hija mħallta sewwa mas-soluzzjoni *buffer* u mas-soluzzjoni florexxenti. Parti minn din it-tahlita hija mbagħad trasferita fil-forma ta' *film* irqiq għal diska li dduur li sservi bhala pjan ta' oġġett għall-mikroskopju.

Kull ċellola tipproduċi polz elettriku li hu amplifikat u rreġistrat. In-numru ta' ċelloli somatiċi hu stampat feluf għal kull ml.

4. **Ir-riagenti**

Kimiċi analitiċi ta' grad għandhom jintużaw sakemm mhux iddikjarat mod iehor. L-ilma għandu jew jiġi distillat jew deonizzat jew ta' purità ekwivalenti.

4.1. *Is-soluzzjoni buffer*

Kompożizzjoni:

Ftalat ta' l-idroġenu tal-potassju	51,0 g
Idrossidu tal-Potassju	13,75 g
<i>Polyethyleneglycol-mono-p(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl-ether</i> (eż. <i>Triton X-100</i>), 1 % skond il-volum	10 ml
pH 5,7 sa 5,9. Żid bl-ilma sa 10 000 ml.	

Preparazzjoni:

Il-komponenti individwali huma mħallta Il-ħażna mitbuqa m'għandhiex teċċedi sebat ijiem.

4.2. *Is-soluzzjoni florexxenti (soluzzjoni stock)*

Kompożizzjoni:

Ethidium bromide	1.0 g
Żid bl-ilma sa 1 000 ml.	

Preparazzjoni:

L-Ethidium bromide hu maħlul fl-ilma. Il-ħażna fi flixxun protett kontra d-dawl u mitbuq u m'għandhiex teċċedi xahrejn.

4.3. *Is-soluzzjoni florexxenti (soluzzjoni operattiva)*

20 ml tas-soluzzjoni *stock* (4.2) huma mħallta mas-soluzzjoni *buffer* (4.1) biex jagħtu 1 000 ml. Is-soluzzjoni operattiva m'għandhiex tintuża għal iktar minn sebat ijiem.

4.4. *Is-soluzzjoni tat-tindif*

Kompożizzjoni:

Soluzzjoni <i>buffer</i> (4.1)	10 ml
<i>Polyethyleneglycol-mono-p(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl-ether</i> (eż. <i>Triton x-100</i>), 1 % skond il-volum	10 ml
L-Ammonja, 25 % skond il-volum	25 ml

Żid bl-ilma sa 10 000 ml Il-

Preparazzjoni:

Il-komponenti individwali huma mħallta Il-ħażna m'għandhiex teċċedi 30 gurnata.

5. **L-apparat u affarijiet tal-ħġieġ**

5.1. *L-istrument ta' l-ghadd*, f'operazzjoni skond il-prinċipju ottiku florexxenti

Nota:

Qabel l-użu l-istrument għandu jiġi kalibrat Ir-relazzjoni bejn il-volum tal-partikoli li għandhom jingħaddu u l-livell għatba li fuqu l-ghadd isir huma hekk determinati. Il-kalibrazzjoni ta' l-apparat issir skond l-istruzzjonijiet tal-fabbrikant bl-użu ta' kampjuni li l-kontenut taċ-ċelloli tagħhom ġie determinat bil-proċedura mikroskopika (A).

5.2. *Banju ta' l-ilma*, b'ċirkolazzjoni, kapaċi li jopera f' 40 ± 1 °C.

5.3. *Test tube*, b'sigill approprijat, bejn wiehed u ieħor 15-il ml.

6. Il-kampjun tal-halib

6.1. Il-kampjun għandu jinħażen f'temperatura baxxa f'*test tube* (5.3) Jekk il-kampjun mhuwiex ippreservat kimi-kament, m'għandux jingħadd fl-24 siegħa wara l-hlib minhabba li l-għadd ikunu baxxi wisq. It-temperatura tal-ħażna m'għandhiex taqbeż 6 °C.

6.2. Il-preservazzjoni

Il-preservazzjoni kimika għandha ssir fi żmien 24 siegħa. Il-preservazzjoni għandha titwettaq kemm jista' jkun malajr wara li jittieħdu l-kampjuni.

6.2.1. Il-preservazzjoni kimika tal-kampjun tista' tiġi akkwistata bl-addizzjoni ta' wiehed mill-preservanti li ġejjin:

— l-aċidu ortoboriku:

il-koncentrazzjoni finali ta' l-aċidu ortoboriku fil-kampjun m'għandhiex teċċedi 0,6 g/100 ml. Dan il-kampjun ippreservat jista' jinħażen għal 24 siegħa ohra f'6 sa 12 °C.

— id-dikromat tal-potassju:

il-koncentrazzjoni finali tad-dikromat tal-potassju m'għandhiex teċċedi 0,2 g/100 ml Dawn il-kampjuni ppreservati jistgħu jinħażnu għal 72 siegħa ohra f'6 sa 12 °C

— l-ażide tas-sodju:

il-kampjuni jistgħu jiġu ppreservati b'ażide tas-sodju sal-koncentrazzjoni finali ta' 0,024g/100ml, sakemm il-kampjun hu mkessah sa 6 sa 12 °C immedjatament wara li jittieħed il-kampjun, u magħdud fi żmien 48 siegħa wara li jittieħed il-kampjun.

— il-bronopol:

il-kampjun jista' jiġi ppreservat bil-bronopol sa koncentrazzjoni finali ta' 0.05 g/100ml, sakemm il-kampjun hu mkessah sa 6 sa 12 °C immedjatament wara li jittieħed il-kampjun, u magħdud fi żmien 72 siegħa wara li jittieħed il-kampjun.

6.2.2. Kampjun diġà ppreservat bl-aċidu ortoboriku jista' jiġi iktar ippreservat għal sa 48 siegħa bl-użu tad-dikromat tal-potassju.

Nota:

Kondizzjonijiet lokali li jirrigwardaw l-iskarika ta' effluwenti għandhom jiġu osservati għal kampjuni ppreservati bid-dikromat tal-potassju.

7. Il-proċedura

7.1. *It-trattament minn qabel tal-kampjun*

Il-halib li għandu jiġi eżaminat għandu jinħażen wara l-hlib għal mill-inqas 24 siegħa f'bejn wiehed u ieħor 2 sa 6 °C. L-għadd tal-kampjuni fil-jum tal-hlib mhux ta' min isir mingħajr trattament minn qabel minhabba li r-riżultati jistgħu ikunu baxxi wisq. Jekk l-għadd ta' dan il-kampjun huwa neċessarju, dan għandu jiġi trat-tat minn qabel għal mill-inqas tliet sigħat bid-dikromat tal-potassju (ara 6.2.1).

7.2. *Preparazzjoni*

Il-kampjun trattat minn qabel (ara 7.1), jew il-kampjun mhux trattat li jkun ilu mill-inqas ġurnata, hu msaħħan f'banju ta' l-ilma (5.2) sa bejn wiehed u ieħor 40 °C Il-kampjun hu mbaġħad maħżun f'temperatura tal-kamra sakemm isir l-għadd.

7.3. *L-għadd taċ-ċelloli*

L-għadd għandu jitwettaq bl-użu ta' strument ta' l-għadd (5.1) fi żmien 15-il minuta mill-ahħar tat-tishin (ara 7.2) Immedjatament qabel l-għadd, il-kampjun għandu jithallat sewwa sabiex tiġi ottenuta distribuzzjoni kemm jista' jkun omogenja taċ-ċelloli somatiċi.

Aktar dilwizzjoni u preparazzjoni tal-kampjun għandha sseħh awtomatikament fl-istrument.

8. Il-preċiżjoni

Figuri għar-rata ta' repetizzjoni (r) u r-riproduċibbiltà (R) minn provi internazzjonali kollaborattivi mhumiex disponibbli. Fil-gejjieni, informazzjoni ta' preċiżjoni tiġi ddikjarata.

L-informazzjoni disponibbli fuq livell nazzjonali tippermetti l-istimi li ġejjin:

(1) Livell tal-kont taċ-ċelloli bejn 400 000 u 500 000/ml

— devjazzjoni standard għar-repetizzjoni:

$$s_r = 20\,000 \text{ ċelloli/ml}$$

(ekwivalenti għal koeffiċjent ta' varjazzjoni jew 5 – 4 %)

— devjazzjoni standard għar-riproduċibbiltà:

$$s_R = 40\,000 \text{ ċelloli/ml}$$

(ekwivalenti għal koeffiċjent ta' varjazzjoni ta' 10 – 8 %)

9. Il-kontroll ta' l-eżattezza

Il-kontroll ta' l-eżattezza jitwettaq bl-użu ta' kampjuni b'kontenuti taċ-ċelloli magħrufa determinati b'għadd ta' ċelloli mikroskopici f'laboratorju nazzjonali ta' referenza.

VIII. IS-SEJBEN TA' ANTIBIJOTIĊI U SULFONAMIDI

L-ISKOP U L-QASAM TA' APPLIKAZZJONI

Din il-proċedura tispesifika il-proċedura ta' referenza għas-sejbien ta' antibijotiċi u sulfonamidi f'halib mhux ipproċessat u f'halib trattat bis-shana.

Il-proċedura ta' referenza tinkludi:

A. Il-metodu kwalitattiv

Din il-proċedura hija l-proċedura inizzjali li permezz tagħha kampjuni tal-halib li jikkontjenu antibijotiċi inklużi sulfonamidi huma magħżula. Il-proċedura deskritta hija waħda minn numru ta' proċeduri simili, li fil-prinċipju kollha jużaw *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*, ATTC 10 149 bhala l-organizmu tat-test. Il-proċedura għet magħżula bhala rappreżentattiva għal dawk it-testijiet.

B. Proċedura għall-konferma u l-identifikazzjoni tal-penicillina

Din il-proċedura għandha tintuża biex tikkonferma r-riżultati tal-proċedura kwalitattiva, għall-identifikazzjoni tal-penicillina u biex tiġi determinata l-koncentrazzjoni tal-penicillina.

A. Proċedura kwalitattiva

1. L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni

Din il-proċedura tispesifika s-sejbien kwalitattiv ta' antibijotiċi u sulfonamidi f'halib mhux ipproċessat u trattat bis-shana ineċċess tal-limiti stabbiliti fit-tabella:

Koncentrazzjonijiet li jinstabu ta' varji antibijotiċi u sulfonamidi ⁽¹⁾

	Is-sensittività tat-test	
	Kollha negattivi	Kollha pożittivi
Benzylpenicillin	0,002	0,006
Ampicillin	0,002	0,005
Cloxacillin	0,015	0,035
Nafcillin	0,006	0,011
Tetracycline	0,10	0,40
Oxytetracycline	0,20	0,45
Chlortetracycline	0,15	0,50
Chloramphenicol	7	15
Dihydrostreptomycin	4	13
Neomycine	1	22
Kanamycin	9	28
Bacitracin	0,06	0,14
Erythromycin	1	2,25
Rifamycin	0,01	0,14
Diaphenylsulfone	0,01	0,1
Sulphamethazine (Sulphadimidine)	0,5	1

⁽¹⁾ Benzylpenicillin u bacitracin espressi bhala IU/ml, l-antibijotiċi l-oħra kollha bhala µg/ml

2. **It-tifsira**

Il-halib jikkontjeni antibijotiċi jew sulfonamidi meta l-kulur tal-*medium* ma jinbidilx (ara 7.1).

3. **Il-prinċipju**

Il-Kampjun tal-halib hu miżjud, flimkien ma' nutrijenti ma' ġel *agar* li jikkontjeni indikatur tal-pH u spori ta' *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* ATCC 10 149 (ara 5.4.1), li għandu sensitività globali tajba u hu partikolarment sensitiv għall-inibizzjoni bil-penicillina. L-inkubazzjoni li tirriżulta fit-tkabbir normali u fil-produzzjoni ta' l-aċidu ta' l-organizmu tikkawża lill-kulur ta' l-indikatur tal-pH biex jinbidel minn vjola għal isfar. Il-preżenza fil-halib ta' sustanzi li huma inibitorji għat-tkabbir ta' l-organizmu tikkawża l-kulur ta' l-indikatur tal-pH biex jibqa' vjola.

4. **L-apparat u l-affarijiet tal-ħġieġ**

It-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u, b'mod partikolari:

4.1. *L-apparat*

4.1.1. L-inkubatur, kapaċi li jzomm temperatura ta' 64 ± 1 °C

4.1.2. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jopera f' 64 ± 1 °C.

4.1.3. *Rack*, għal tubi jew ampulli

4.1.4. Pipetta, ponot għal użu wiehed li jstgħu jintremew tajbin biex jittiehdu kampjuni u li jiddispensaw 0,1 ml

4.1.5. Forċeps jew pinzetti

4.1.6. Forn ta' l-arja sħuna, kapaċi li jopera f' 170 sa 175 °C

4.1.7. Awtoklavi, kapaċi li jopera f' 121 ± 1 °C

4.1.8. pH-meter.

4.2. *Affarijiet tal-ħġieġ*

4.2.1. Fliexken tal-kampjuni b'għeluq xieraq

Nota:

Xi tappijiet tal-gomma jistgħu jiddepożitaw sustanzi inibitorji fuq l-għonq tal-fliexkun.

4.2.2. Kontenituri Petri, ta' ħġieġ ċar, mingħajr kulur jew materjal sterili sintetiku b'qigħan ċatti ta' hxuna uniformi, b'dijametru minimu intern ta' madwar 140 mm.

4.2.3. Fliexken, ta' kapaċità ta' 250 ml.

4.2.4. Pipetti, (miżduda bit-tajjar) tal-ħġieġ jew materjal sterili sintetiku ta' kapaċità nominali ta' 1 ml u 10 ml.

4.2.5. Spatuli tal-ħġieġ

4.2.6. Tubi jew ampulli, dijametru intern madwar 8 mm, b'tappijiet jew b'għotjen.

4.2.7. L-isterilizzazzjoni ta' affarijiet tal-ħġieġ:

L-affarijiet tal-ħġieġ għandhom ikunu sterilizzati b'wahda mill-proċeduri li ġejjin:

(a) billi jinżammu f'170 sa 175 °C għal mhux inqas minn siegħa f'forn ta' l-arja sħuna (4.1.6);

(b) billi jinżammu f' 121 ± 1 °C għal mhux inqas minn 20 minuta f'awtoklavi (4.1.7).

Fl-awtoklavi għandu jkun hemm attenzjoni biex tiġi assigurata penetrazzjoni adegwata ta' fwar – eż. jekk it-tagħmir hu sterilizzat f'kontenituri, dawn m'għandhomx ikunu magħluqin issikkati, il-fliexken għandu jkollhom għotjen mahlula.

Affarijiet tal-ħġieġ sterilizzati fl-awtoklavi għandhom jitnixxfu billi jiġi ventilat il-fwar.

Il-pipetti għandhom jiġu sterilizzati f'forn bl-arja sħuna.

5. **Il-medja, soluzzjonijiet, l-organizmu tat-test**

L-ingredjenti tal-medja għandhom ikunu tajbin għal skopijiet batterjoloġiċi L-ilma użat għandu jkun distillat fil-ħġieġ jew dimineralizzat ta' mill-inqas purità ugwali. M'għandux jikkontjeni sustanzi inibitorji għall-organizmu tat-test.

5.1. *Il-medja*

5.1.1. L-Agar nutrijent

Kompożizzjoni

Estratt tal-hmira	2 g
Peptone	5 g
Estratt tal-laħam	1 g
Klorur tas-sodju	5 g
Agar	10 – 15 g
L-ilma	1 000 ml

Il-preparazzjoni

Holl il-komponenti fl-ilma. Ghalli, billi ddawwar minn żmien għal żmien. Agġusta l-pH sabiex wara l-sterilizzazzjoni hu $7,4 \pm 0,1$ b' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ferra' kwantitajiet ta' 10 ml f' *test tubes* biex tagħmel mejliet ta' agar jew kwantitajiet ta' 100 ml fi flieken.

Sterilizza f' $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal 15-il minuta.

5.1.2. *Il-medium ta' l-agar*

Kompożizzjoni

Klorur tas-sodju	2 g
Agar	15 g
Ilma	1 000 ml
Soluzzjoni tat- <i>Trimethoprim</i> jew <i>Tetroxoprim</i> (ara 5.1.3) ⁽¹⁾	10 ml

⁽¹⁾ Leġislażjoni ta' patenti dwar l-użu tal-medja tal-kultura li tikkontjeni sustanzi anti-foljati għandha tiġi osservata.

Il-preparazzjoni

Holl il-komponenti hlief it-*trimethoprim* jew it-*tetroxoprim* fl-ilma. Ghalli, billi ddawwar minn żmien għal żmien. Żid it-*trimethoprim* jew it-*tetroxoprim* u sterilizza f' $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal 15-il minuta; agġusta l-pH sabiex wara l-sterilizzazzjoni hija $7,0 \pm 0,1$ b' $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.3. Is-soluzzjoni tat-*trimethoprim* jew tat-*tetroxoprim*

Kompożizzjoni

<i>Trimethoprim</i>	5 mg
Jew <i>Tetroxoprim</i>	30 mg
Etanol 96 %	5 ml/30 ml
Ilma sa	1 000 ml

Il-Preparazzjoni

Holl it-*trimethoprim* jew it-*tetroxoprim* fl-etanol (5 jew 30 ml) u d-diluwixxi bl-ilma.

5.1.4. Nutrijent

Kompożizzjoni

Estratt tal-hmira	0,75 mg
Glukosju	5,0 mg
Lamtu solubili	8,0 mg
Bromokresol vjola	0,025 g
Ilma sa	50 ml

Il-preparazzjoni

Holl in-nutrijenti u l-indikatur fl-ilma, jekk neċessarju billi ssahhan, sterilizza b'filtrazzjoni. In-nutrijent hu kummerċjalment disponibbli bħala *tablets*.

5.2. *Soluzzjonijiet standard tal-penicillina*

5.2.1. Ipprepara soluzzjoni tal-penicillina ta' 60 µg/ml = (100 IU/ml) billi tholl sodju tal-kristallina jew penicillina tal-*potassium benzyl* f'ilma distillat sterili fi flieken approprijat sterili magħluq.

5.2.2. Ipprepara soluzzjoni operattiva ta' penicillina billi żżid 1,25 ml tas-soluzzjoni tal-penicillina (5.2.1) sa 1 000 ml b'ilma sterili distillat. Din is-soluzzjoni operattiva tikkontjeni 0,075 µg (= 0,125 IU/ml).

5.2.3. Ipprepara 75 ml ta' soluzzjoni standard tal-penicillina li tikkontjeni 0,004 mg/ml (= 0,0067 IU/ml) billi żżid 71 ml halib hieles minn inibitorji (5.3) ma' 4 ml ta' soluzzjoni operattiva ta' penicillina (5.2.2) u thallat.

- 5.2.4. Is-soluzzjonijiet tal-penicillina msemmija f'5.2.1 sa 5.2.3 għandhom jiġu ppreparati fil-ġurnata li fiha jsir it-test.
- 5.3. *Halib hieles minn inibitorji*
- Ipprepara bhala kontroll halib hieles minn inibitorji billi tirrikostitwixxi trab ta' halib xkumat (10.5 m/v) eżaminat minn qabel u miżjud hieles minn sustanzi inibitorji, filma sterili distillat. Alternattivament, kwantità suffiċjenti ta' halib frisk bl-ingrossa kkontrollat u misjub hieles minn sustanzi inibitorji jista' jifferra' fi fliexken, imsaħħna għal siegħa f' 100 °C u mbagħad jinħażen fi friġġ bejn 0 u 6 °C għal perjodu massimu ta' ġimgha.
- 5.4. *L-organizmu tat-test*
- 5.4.1. It-tendenza *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactus* ATCC 10 149 hi użata bhala l-organizmu tat-test. It-tendenza hi identika għal C 953.
- 5.4.2. Ipprepara kultura *stock* biex tinzamm il-kultura tat-test. Il-kultura tat-test tinzamm fuq mejla ta' *agar* nutrijent (5.1.1) Il-mejla ta' l-*agar* hi mlaqqma b'leħha mis-superfici, bl-użu ta' holqatal-kultura tat-test, u tinzamm inkubata ajrubikament għal 48 siegħa f' 63 ± 1 °C Wara l-inkubazzjoni, it-tubu hu ssiġillat, bl-użu ta' għeluq sterili tal-gomma. Il-kultura *stock* hekk ottenuta tista tinzamm għal diversi xhur fi friġġ bejn 0 u 5 °C.
- 5.5. *Il-kultura tat-test (is-sospensjoni ta' l-ispori)*
- 5.5.1. 20 ml tan-nutrijent ta' l-*agar* (5.1.1) hu ttrasferit aseptikament għal kontenitur sterili Petri (4.2.2) u mkessah għat-temperatura tal-kamra.
- 5.5.2. B'pipetta sterili (4.2.4) ittrasferixxi 5 ml ilma sterili distillat għal tubu b'kultura *stock* (5.4.2) u aħsel l-ispori mill-mejla ta' l-*agar* bl-użu ta' holqa sterili. Din is-sospensjoni ta' l-ispora għandha tinzamm bejn 0 sa 5 °C u għandha tintuża fi żmien 36 siegħa.
- 5.5.3. B'pipetta sterili (4.2.4) ittrasferixxi 0,5ml tas-sospensjoni ta' l-ispora (5.5.2) għal pjanċa kultura (5.5.1) u xerred l-*inoculum* sewwa tul is-superfici kollu b'bastun mgħawweġ tal-ħġieġ. Inkuba f' 63 ± 1 °C (4.1.1) għal 16 sa 18-il siegħa.
- Meta tuża kultura *stock* (5.4.2), jew kultura li għandha iktar minn 36 sena, il-proċedura subkulturali għandha titwettaq mill-inqas darbtejn b'mhux iktar minn intervall ta' 36 siegħa bejn is-subkultura.
- 5.5.4. Ittrasferixxi bl-użu ta' pipetta sterili (4.2.4) 10 ml ta' ilma distillat għall-*plate* kulturali (5.5.3) u nehhi l-ispori mis-superfici għas-sospensjoni bl-użu ta' bastun tal-ħġieġ.
- Ittrasferixxi s-sospensjoni ta' l-ispora għal flixxun (4.2.3) li jikkontjeni ilma sterili distillat. Aghlaq il-flixxun u hawwad sew. Il-kulturi li m'għandhomx jiġu subkulturali immedjatament għandhom jinħażnu fi friġġ f' 0 sa 6 °C.
- 5.5.5. Is-sospensjoni ta' l-ispora għandu jkollha għadd ta' kolonja vijabbli bejn 5 u 10 miljun għal kull ml fuq *medium agar* ta' kont tal-*plates* inkubat fi 63 ± 1 °C għal 16 sa 18-il siegħa. Is-sospensjoni ta' l-ispora għandha tkun imdardra b'mod uniformi u jekk tikkontjeni *flocks* jew sediment għandha tintrema u sospensjoni ġdida għandha tiġi ppreparata mill-kultura *stock* (5.4.2).
- 5.6. *Il-preparazzjoni tat-test tubes/ampolli*
- 5.6.1. Dewweb il-*medium agar* (5.1.2) u kessah sa 55 °C
- 5.6.2. Żid parti wahda ta' sospensjoni friska ta' l-ispora (5.5.4) ma' hames partijiet ta' *medium agar* (5.6.1) f' tubu jew flixxun, hallat sewwa.
- 5.6.3. Ittrasferixxi 0,3 ml tal-medja mlaqqma (5.6.2) kkalkulata biex tagħti saff 5 mm ohxon għal tubu sterili jew ampolla (4.2.6) u aghlaq b' tapp jew għatu jew billi ddewweb il-ponta. Halli *t-test tubes*/l-ampolli jikshu f'pożizzjoni wieqfa, ippermetti li l-*medium* jissolidifika u mbagħad halli wieqfa għal mill-inqas 12-il siegħa.
- 5.6.4. It-*test-tubes*/l-ampolli jistgħu jintużaw fl-istess ġurnata, imma jistgħu jinżammu diversi xhur sakemm jikkesshu immedjatament wara l-preparazzjoni u jinżammu bejn 0 u 6 °C.
6. **Il-proċedura**
- 6.1. Il-kampjuni għandhom jiġu kkontrollati kemm jista' jkun malajr possibbli u preferibbilment fi żmien 24 siegħa milli jittiehed il-kampjun, waqt li l-kampjuni jinżammu bejn 0 u 5 °C sadanittant. Jekk mhuwiex possibbli li l-kampjuni jiġu kkontrollati fi żmien 24 siegħa, għandhom jinżammu f'kesha kbira (-30 sa -15 °C) biex tiġi mminimizata l-inattivazzjoni tal-penicillina.

- 6.2. Identifika kull tubu/ampolla (5.6) b'mod li jinqara u li ma jithassarx. Nehhi l-għatu jew it-tapp Qieghed in-numru mehtieg għall-kampjuni u l-kontrolli (5.2 u 5.3) li għandhom jiġu eżaminati *frack* xierqa.
- 6.3. Żid 50 mikrolitru tan-nutrijent imsemmi f'5.1.4 ma' kull tubu/ampolla.
- 6.4. Hallat il-kampjun tal-halib sewwa u ttrasferixxi b'siringa (4.1.4) 0,1 ml fit-tubu/ampolla ttikkettata korrispondenti. Uża ponta nadifa li tista' tintrema għal kull kampjun li għandu jiġi trasferit.
- 6.5. Irrepeti l-operazzjoni deskritta f'6.4 darbtejn bl-użu tas-soluzzjoni standard tal-penicillina li tikkontjeni 0,004 ug/ml (= 0,0067 IU/ml) penicillina minflok il-kampjun tal-halib(5.2.3)
- 6.6. Irrepeti l-operazzjoni f'6.4 għal darbtejn bl-użu tal-kontroll tal-halib b'inibizzjoni hielsa (5.3) minflok il-kampjun tal-halib.
- 6.7. Aghlaq it-tubi/l-ampolli u qieghed fir-rack li jikkontjeni t-tubi/l-ampolli f'banju ta' l-ilma f' 63 ± 1 °C (4.1.2) għal mill-inqas $2\frac{1}{2}$ sa $2\frac{3}{4}$ siegħa.
- 6.8. Nehhi r-rack li jikkontjeni t-tubi/l-ampolli mill-banju ta' l-ilma.
- 6.9. Osserva l-kultur tal-medium tat-test (ara 7).

7. L-interpretazzjoni tar-riżultati

- 7.1. Kolorazzjoni vjola tal-medium tat-test fi kwalunkwe kampjun tal-halib jew tubi/ampolli ta' kontroll tindika l-preżenza ta' antibijotiċi jew sulfonamidi fil-jew madwar il-livell "pożittiv" fit-tabella fuq il-paġna 39 fil-kampjun. Il-kolorazzjoni tat-tubi/l-ampolli b'soluzzjoni standard tal-penicillina (6.5) għandha tibqa' vjola biex tipproma li l-medium tat-test hi sensitiva biżżejjed.
- 7.2. Kolorazzjoni vjola biss ta' parti mill-medium tat-test jew kolorazzjoni irregolari fi kwalunkwe tubi/ampolli kampjun tal-halib tindika sustanzi inibitorji bejn il-livelli mogħtija fit-tabella fuq il-paġna 39 fil-kampjun.
- 7.3. Kolorazzjoni safra tal-medium tat-test fi kwalunkwe kampjun tal-halib jew tubi/ampolli ta' kontroll tindika l-assenza tas-sustanzi inibitorji għall-organizmu tat-test.
- 7.4. Jekk ikun hemm kolorazzjoni vjola fit-tubi/ampolli kkontrolati kollha, inkluż il-kontroll negattiv, it-tubi/ampolli ma jikkontjenux spori vijabbli u l-kampjuni għandhom jerggħu jiġu eżaminati b'materjali tat-test friski ppreparati.

8. Il-konferma tar-riżultati

- 8.1. Ikkonferma l-kampjuni kollha b'reazzjonijiet kif deskritti f'7.1 u 7.2 skond il-"Metodu B".

Jekk il-hażna tal-kampjuni tal-halib hija neċessarja qabel il-konferma, għandhom ikunu ffrizati sewwa biex jipprevienu d-degradazzjoni ta' l-antibijotiċi.

B. Proċedura għall-konferma ta' penicillini u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni.

1. L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni

Il-proċedura tispeċifika t-test konfermatorju għal penicillini u antibijotiċi barra minn penicillini u proċedura għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-penicillina fil-kampjuni tal-halib b'reazzjoni pożittiva (A.7.1) jew dubjuża.

Is-sensittività ta' l-antibijotiċi varji bil-proċedura

ara A.1.

2. It-tifsira

- 2.1. Il-kampjun tal-halib jikkontjeni antibijotiċi li jinkludu sulfonamidi meta l-kampjun bil-proċedura deskritta jagħti żona ċara ta' mill-inqas 2 mm ta' inibizzjoni madwar id-diska.

- 2.2. Jekk kampjun li jikkontjeni antibijotiċi jinkludi s-sulfonamidi (2.1) u li ghalih il-penicillinase (*betalactamse*) ġie miżjud ma jaghti ebda żona ċara jew żona ċara ta' dijametru iżgħar milli mingħajr il-penicillinase is-sustanza inibitorja hija jew penicillina jew kemm penicillina u antibijotika oħra inklużi s-sulfonamidi.
- 2.3. Jekk iż-żona mhijiex attivata bil-penicillinase (2.2) is-sustanza inibitorja fil-kampjun tal-halib mhijiex penicillina, imma tista' tkun residwu ieħor (ara d-Direttiva 85/397/KEE, l-Anness A, il-Kapitolu VI, A.1.f u 2 b). Xi ftit mill-penicillini semi-sintetiċi, eż il-*cloxacillin* tas-sodju, mhumiex jew biss parzjalment inattivati bil-penicillinase jew kompletament reżistenti u mhumiex għalhekk identifikati bħala penicillina (ara 7.3).

3. Il-prinċipju

Diska ta' karta assorbenti imprenjata bil-halib li għandha tiġi eżaminata titqiegħed fuq is-superfici ta' *medium agar* imlaqqam bil-*Bacillus stearothermophilus*, var. *Calidolactis*. L-inkubazzjoni li tirriżulta fit-tkabbir normali ta' l-organizmu tikkawża lill-*agar* biex jissahhab. Il-preżenza fil-halib tas-sustanzi li huma inibitorji għall-koltivazzjoni ta' organismi hi indikata b'żona ċara madwar id-diska. Id-daqs taż-żona ċara jiddependi, fost affarijiet oħrajn, fuq il-konċentrazzjoni u t-tip ta' sustanza inibitorja fil-halib.

4. Apparat, affarijiet tal-ħġieġ u tagħmir

- 4.1. *L-apparat*
- 4.1.1. Ara A.4.1.
- 4.1.2. Banju ta' l-ilma, kapaċi li jopera f' 80 ± 1 °C.
- 4.2. *Affarijiet tal-ħġieġ*
- Ara A.4.2.
- 4.3. Diski tal-karta, hielsa minn inibitorji, dijametru 9 sa 13-il mm, kapaċi li jiehdu bejn wieħed u ieħor 130 mg ta' halib (preferibbilment maħżuna f'dessikator).

5. Il-medja, soluzzjonijiet standard, soluzzjoni penicillinase, riagenti, organismu tat-test eċċ.

L-ingredjenti tal-medja għandhom ikunu tajbin għal skopijiet batterjoloġiċi L-ilma użat għandu jkun distillat fil-ħġieġ jew dimineralizzat ta' mill-inqas purità ugwali. M'għandux jikkontjeni sustanzi inibitorji għall-organizmu tat-test.

- 5.1. *Il-medja*
- 5.1.1. Agar nutrijent (A.5.1.1)
- 5.1.2. *Il-medium* tat-test għas-sejbi ta' sustanzi inibitorji

Kompożizzjoni

Estratt tal-ħmira	2,5 g
Trittonju	5 g
Glukosju	1 g
Soluzzjoni Trimethoprim jew Tetroxoprim (ara 5.1.3)	10 ml
Agar	10 – 15 g (jiddependi fuq il-kwalità tat-tagħqid)
Ilma	1 000 ml

Il-preparazzjoni

Il-komponenti solidi huma kompletament mahlula fl-ilma billi jissahhnu u jithawdu qabel ma tiżdied is-soluzzjoni *trimethoprim* jew *tetroxoprim*. Wara li tiżdied is-soluzzjoni tat-trimethoprim jew tat-tetroxoprim il-pH għandha tiġi aġġustata sabiex wara l-sterilizzazzjoni tkun $8,0 + 0,1$ f' 25 °C. Il-*medium* hu sterilizzat għal 15-il minuta f' 121 ± 1 °C.

- 5.2. *Soluzzjonijiet standard tal-penicillina fil-halib.*

ara A 5.2

Għall-kwantifikazzjoni ta' sustanzi inibitorji (8) aghmel soluzzjonijiet standard tal-penicillina f' halib hieles minn inibitorji (A.5.3) bil-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

- (a) 0,004 µg/ml (0,0067 IU/ml)
- (b) 0,006 µg/ml (0.01 IU/ml)
- (ċ) 0.03 µg/ml (0.05 IU/ml)
- (d) 0.06 µg/ml (0.1 IU/ml)

5.3. Soluzzjoni tal-penicillinase

- 5.3.1. Holl pellicillinase biżżejjed (*betalactamase*) filma sterili distillat biex taghti konċentrazzjoni ta' 1 000 U/ml Din is-soluzzjoni preferibbilment maqsuma f'porzjonijiet żgħar tista' tinhażen f'0 sa 5 °C sa erba' ġimgħat.

Nota:

Ma hemm ebda standard internazzjonali uniformi għall-penicillinase. Għall-iskop ta' din il-proċedura, hu assunt li 10 unitajiet ta' penicillinase jkunu suffiċjenti biex jiddiżattivaw 0,6 µg (= 1 IU) ta' penicillina. Għal fornituri ta' penicillinase ta' saħħa mhux magħrufa jkun neċessarju li jiġi eżaminat jekk din l-assunzjoni hijiex valida. Inkella huwa neċessarju li tinbidel il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-penicillinase b' mod korrispondenti.

- 5.3.2. Minflok is-soluzzjoni tal-penicillinase, diski kummerċjalment disponibbli ppreparati bil-penicillinase jistgħu jintużaw jekk, wara proċedura ta' kontroll jinstab li jikkontjenu ammont approprjat ta' penicillinase.

5.4. L-organizmu tat-test

Ara A 5.4

5.5. Il-kultura tat-test (is-sospensjoni ta' l-ispori)

Ara A 5.5

5.6. Il-preparazzjoni tal-plates tat-test

- 5.6.1. Dewweb il-medium tat-test għas-sejbien ta' sustanzi inibitorji (5.1.2) u kessah sa 55 °C.
- 5.6.2. Żid fi flixxun parti waħda ta' sospensjoni friska ta' l-ispori (5.5) ma' dak in-numru ta' partijiet tal-medium tat-test għas-sejbien ta' sustanzi inibitorji (5.1.2) li jagħti densità approprjata tal-kolonji fil-medium tat-test imlaqqma u hallat sewwa.
- 5.6.3. Ittrasferixxi għal kontenitur Petri sterili (A.4.2.2), qabel imsaħħan għal 55 °C, il-medium tat-test inokulat (5.6.2) biex jagħti saff 0,6 sa 0,8 mm ohxon. Għal kontenitur Petri ta' dijametru intern ta' 140 mm madwar 15 ml ta' medium tat-test huwa neċessarju sabiex tiġi ottenuta ħxuna ta' 0,8 mm.
- 5.6.4. Ittrasferixxi l-kontenituri Petri għal superfiċi kiesaħ orizzontali qabel ikkontrollat b'livell ta' spirtu, neħhi l-ghotjen u halli l-medium ta' l-agar jissolidifika. Meta l-medium ikun issolidifika, l-ghotjen huma sostiwiti fuq il-kontenituri li huma mbaġħad maqluba biex jimminimizzaw il-kondensazzjoni fuq is-superfiċi tal-medium ta' l-agar.
- 5.6.5. Il-plates tat-test hekk ippreparati jintużaw preferibbilment fl-istess ġurnata, imma jistgħu jinżammu sa ġimgħtejn sakemm jinżammu f'borża ssiġillata tal-poliutilin f'5 °C immedjatament wara l-preparazzjoni.
- 5.6.6. Sabiex jiġu identifikati l-kampjuni mmarka l-qiegh tal-plates tat-test.

6. Il-proċedura

6.1. Il-preparazzjoni tal-kampjun

- 6.1.1. Kampjuni li jagħtu riżultati pożittivi jew dubjużi fil-"Metodu A" (A.7.1 u A.7.2) għandhom jiġu kkontrollati mill-ġdid, identifikati u kkwantifikati bħala penicillina.
- 6.1.2. Inizjalment dawn il-kampjuni tal-halib huma msahħna fi 80 ± 1 °C għal 10 minuti, sabiex tiġi evitata influwenza mill-inibituri mhux speċifiċi termolabili.
- 6.1.3. Wara li thallat sewwa, bejn wieħed u iehor 10 ml tal-halib imsaħħan tat-test hu trasferibbli għal flixxun addat-tat sterili b'għonq wiesa. Madwar 0,4 ml tas-soluzzjoni tal-penicillinase (5.3) hu miżjud mal-halib u mhallat sewwa.

- 6.2. *Is-sejbien ta' l-inibituri*
- 6.2.1. Bill diska tal-karta (4.3) fil-kampjun tal-halib (6.1.2) billi tuża par forċeps nodfa niexfa. Nehhi xi halib żejjed billi tmiss id-diska mal-ġenb tal-flixxun tal-kampjun. Qieghed id-diska ċatta fuq is-superfici tat-test plate (5.6) u aghfas 'l isfel bil-mod bil-forċeps.
- 6.2.2. Id-diski ppreparati bil-kampjuni differenti tal-halib għandhom ikunu mill-inqas 20 mm minn xulxin u mill-inqas 10 mm mit-tarf.
- 6.2.3. Sabiex tiġi eżaminata s-sensittività, id-diski (4.3) mbilla fis-soluzzjoni standard tal-penicillina (5.2) għandhom jitqiegħdu addoċ bejn id-diski tal-kampjuni tal-halib b'rata ta' mill-inqas 2 % tan-numru ta' diski tal-kampjuni tal-halib u mill-inqas hames diski standard għandhom jintużaw tul kull test.
- 6.2.4. Meta d-diski kollha jkunu tqiegħdu fuq il-medium agar b'mod addoċ u jkunu ġew identifikati, aqleb il-plates u inkubahom f'63 ± 1 °C għal 2½ sa hames sigħat.
- 6.2.5. Wara l-inkubazzjoni l-plates huma eżaminati quddiem sors ta' dawl addattat għal żoni hielsa minn inibizzjoni madwar id-diski tal-karti. Iż-żoni hielsa huma mkejla.
- 6.2.6. Iż-żoni madwar id-diski li jikkontjenu s-soluzzjoni standard tal-penicillina (6.2.3) għandhom ikunu mill-inqas 2 mm.
- 6.2.7. Żoni hielsa madwar id-diski li jikkontjenu l-kampjun tal-halib ta' mill-inqas l-istess daqs jew ikbar minn dak f'6.2.6 jindikaw sustanzi li jinibixxu l-organizmu tat-test.
- 6.3. *L-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tas-sustanzi inibitorji*
- 6.3.1. Il-Proċedura 6.2. titwettaq għal darbtejn fuq il-kampjun tal-halib imsahhan (6.1.2) u fuq il-kampjun trattat bil-penicillinase (6.1.3) Minflok li żżid il-penicillinase ma' 10 ml tal-kampjun tal-halib diska ppreparata tal-penicillinase (5.3.2) tista' titbill f'dan il-kampjun u titqiegħed fuq it-test plate.
- 6.3.2. Il-Proċedura 6.2.1 titwettaq għal darbtejn għal kull wiehed mis-soluzzjonijiet standard tal-penicillina msemmija f' 5.2. (a)-(d).
- 6.3.3. Id-djometri medji taż-żoni hielsa minn inibizzjoni għall-kontroll tal-kampjun tal-halib u tal-penicillinase kif ukoll għas-soluzzjonijiet standard tal-penicillina għandhom jiġu determinati.
7. **L-interpretazzjoni tar-riżultati (ara 2)**
- 7.1. Jekk ma hemm ebda żona hielsa madwar id-diska li tikkontjeni l-kontroll tal-penicillinase, imma hemm żona hielsa madwar id-diska li tikkontjeni l-kampjun tal-halib, daqs jew akbar miż-żona madwar id-diska li tikkontjeni s-soluzzjoni standard tal-penicillina (5.2(a)), is-sustanza inibitorja fil-kampjun tal-halib tikkorrispondi għal konċentrazzjoni tas-sodju-(potassju)-benzil-penicillina ta' mill-inqas 0,004 µg/ml/.
- 7.2. Jekk id-dijametru medju taż-żona hielsa madwar id-diska li tikkontjeni l-penicillinase hija daqs id-dijametru medju taż-żona hielsa madwar id-diska li tikkontjeni l-kampjun tal-halib il-halib jikkontjeni sustanzi inibitorji li huma impossibbli li jiġu inattivati bil-konċentrazzjonijiet tal-penicillinase użati f'din il-proċedura.
- 7.3. Jekk id-dijametru medju taż-żona hielsa madwar id-diska li tikkontjeni l-penicillinase huwa iżgħar mid-dijametru medju taż-żona hielsa madwar id-diska li tikkontjeni l-kampjun tal-halib imsahhan skond 6.1.2, il-kampjun tal-halib jikkontjeni l-penicillina flimkien ma' antibijotiċi oħrajn inkluzi s-sulfonamidi kif ukoll il-penicillina jew il-penicilina semi-sintetika, li ma jistgħux jiġu identifikati bil-konċentrazzjoni tal-penicillinase użati f'din il-proċedura. Penicillini sintetiċi, bħas-sodju cloxacillin, ma jistgħux jiġu inattivati bil-penicillinase taht il-kondizzjonijiet tat-test u jistgħu għalhekk jiġu kklassifikati bħala inibituri ta' xort'oħra mill-penicillina.
- Nota*
Sustanzi inibitorji ta' xort' oħra mill-penicillina jistgħu jekk meħtieġ jiġu identifikati bl-użu ta' proċeduri addattati.
8. **Id-determinazzjoni tal-kontenut tal-penicillina**
- 8.1. Id-determinazzjoni tal-kontenut tal-penicillina tista' ssir jew wara li titpenġa kurva standard jew permezz tal-kalkolu mid-daqsijiet taż-żoni ottenuti bis-soluzzjonijiet standard tal-penicillina fil-halib (5.2.(a)-(d)).

8.2. *It-tpiġġja ta' kurva standard*

Ladarba hemm korrelazzjoni linjari bejn il- \log^{10} tal-konċentrazzjoni tal-penicillina u d-dijametru taż-żoni inibitorji, il-kurva standard tista' titpenġa fuq karta semilogaritmika bil-konċentrazzjonijiet tal-penicillina bhala l-ordinat logaritmiku u ż-żoni inibitorji bhala l-axxiża. Iż-żoni inibitorji huma kkalkulati bhala l-medja tat-testijiet duplikati. Id-djometri taż-żoni inibitorji huma *plotted* kontra l-konċentrazzjonijiet standard tal-penicillina, u l-kurva standard titpenġa.

8.3. *Il-kalkolu*

Il-konċentrazzjonijiet tal-penicillina fil-kampjun tal-halib jistgħu jiġu kkalkulati mid-dijametru taż-żoni taġħ-hom bl-użu ta' l-ekwazzjoni jew tal-kurva standard. Għall-eżattezza r-radju taż-żoni ta' inibizzjoni għandu jkun mill-inqas darbejn u mhux akbar minn hames darbiet tar-radju tad-diski.

9. **L-espressjoni tar-riżultati**

9.1. Ir-riżultati huma espressi bhala l-kontenut tal-penicillina daqs jew akbar minn 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (jew billi tiġi indikata l-konċentrazzjoni determinata) jew bhala l-kontenut ta' l-inibituri ta' xort'oħra mill-penicillina.

9.2. *Ir-rata tar-repetizzjoni (r) u r-Riproduċibbiltà (R)*

Il-figuri mhumiex disponibbli u m'għandhomx tifsira għaliex hemm inkluz standard għall-paragun.

IX. IS-SEJBIEN TA' MIKRO-ORGANIŻMI PATOĠENIĊI**1. L-iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni**

Skond id-Direttiva 85/397/KEE il-htieġa l-Anness A, il-Kapitolu VII(2), din il-proċedura taghti l-istruzzjonijiet li għandhom jiġu segwiti biex il-halib pasturizzat jiġi kkontrollat għal mikro-organizzmi patoġeniċi.

2. It-tifsira

Għandu jsir eżami għal speċi ta' batterji li huma l-iktar frekwentement involuti f'mard mill-ikel.

Il-pasturizzazzjoni huwa trattament li jissalvagwarda kontra l-preżenza ta' patoġeniċi nontermoreżistenti fil-halib. Jekk l-istandards stabbiliti fl-Anness A, il-Kapitolu VII(2) tad-Direttiva għall-ghadd tal-kolonji fi 30 °C u 21 °C, koliformi u *phosphatase* jintlaħqu, test speċifiku għall-patoġeniċi huwa biss neċessarju meta hemm suspett li l-halib hu konness ma' avvelenament mill-ikel.

3. Il-proċedura

Il-proċeduri u l-frekwenzi għall-kontroll għandhom jiġu stabbiliti mill-awtorità nazzjonali, b'mod li jkun possibbli li jinharġu ċertifikati tas-Saħħa li jikkonċernaw halib trattat bis-shana għal kummerċ intra-Komunitarju. Għas-sejbien ta' mikro-organizzmi patoġeniċi applika l-kriterji u l-proċeduri li huma internazzjonalment aċċettati jekk huma disponibbli.

4. Ir-rapport tar-riżultat

Għal kull mikro-organizzmu patoġeniku investigat ir-riżultat għandu jiġi espress bil-mod li ġej:

In-numru għal kull ml ta' halib jew "preżenza" jew "assenza" fil-volum ta' halib pasturizzat meħtieġ mill-proċedura użata. Ir-rapport għandujiddeskrivi b'mod ċar il-proċedura użata.
