

31984L0004

18.1.1984

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 15/28

**DIREKTIVA KOMISIJE**  
**z dne 20. decembra 1983**  
**o spremembi direktiv 71/393/EGS, 72/199/EGS in 78/633/EGS o določitvi analitskih metod Skupnosti za**  
**uradni nadzor krme**

(84/4/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme <sup>(1)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu Grčije, in zlasti člena 2 Direktive,

ker direktive Komisije 71/393/EGS <sup>(2)</sup>, 72/199/EGS <sup>(3)</sup> in 78/633/EGS <sup>(4)</sup> določajo analitske metode za surova olja in masti, virginiamicin in cink bacitracin; ker je treba te metode zamenjati z metodami, ki upoštevajo najnovejša znanstvena in tehnična spoznanja;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem stalnega Odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

*Člen 1*

V Prilogi k Direktivi 71/393/EGS se del IV „Določevanje vsebnosti surovih olj in masti“ nadomesti s Prilogo I k tej direktivi.

*Člen 2*

V Prilogi II k Direktivi 72/199/EGS se del 5 „Določevanje vsebnosti virginiamicina z difuzijo na agarskem gojišču“ nadomesti s Prilogo II k tej direktivi.

*Člen 3*

V Prilogi k Direktivi 78/633/EGS se del 1 „Določevanje vsebnosti cink bacitracina z difuzijo na agarskem gojišču“ nadomesti s Prilogo III k tej direktivi.

*Člen 4*

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za usklajitev s to direktivo, najpozneje do 1. junija 1984 in o tem takoj obvestijo Komisijo.

*Člen 5*

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 20. decembra 1983

Za Komisijo  
Poul DALSGER  
Član Komisije

<sup>(1)</sup> UL L 170, 3.8.1970, str. 2.

<sup>(2)</sup> UL L 279, 20.12.1971, str. 7.

<sup>(3)</sup> UL L 123, 29.5.1972, str. 6.

<sup>(4)</sup> UL L 206, 29.7.1978, str. 43.

## PRILOGA I

## „4. DOLOČANJE VSEBNOSTI NEPREČIŠČENIH OLJ IN MASTI

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti vsebnost neprečiščenih olj in masti v krmi. Ne zajema analize oljnih semen in oljnatega sadja, opredeljene v Uredbi Sveta 136/66/EGS z dne 22. septembra 1966.

Glede na vrsto krme je treba uporabiti enega od opisanih postopkov.

1.1 *Metoda A*

Uporablja se za naravno krmo rastlinskega izvora, razen za tisto, ki vsebuje olja in masti, ki jih s petroletrom brez predhodne hidrolize ni mogoče povsem ekstrahirati. Sem sodijo rastlinska lepila, kvasila in soja ter krompirjeve beljakovine. Ta metoda se uporablja tudi za krmne mešanice, razen za tiste, ki vsebujejo mleko v prahu, ali za tiste, iz katerih olj in masti brez predhodne hidrolize ni mogoče povsem ekstrahirati s petroletrom.

1.2 *Metoda B*

Uporablja se za naravno krmo živalskega izvora ter za krmo, opredeljeno v točki 1.1 kot izjeme, za katere se uporablja metoda A.

2. **Princip**2.1 *Metoda A*

Vzorec se ekstrahira s petroletrom. Topilo se destilira, ostanek pa posuši in stehta.

2.2 *Metoda B*

Vzorec se toplotno obdela s klorovodikovo kislino. Mešanica se ohladi in filtrira. Ostanek se opere, posuši ter skladno z metodo A se določi njegova vsebnost.

3. **Reagenti**

3.1 Petroleter, vrelišče: med 40 in 60 °C. Vrednost broma mora biti manjša od 1, ostanek izhlapevanja pa manjši od 2 mg/100 ml.

3.2 Natrijev sulfat, brezvoden.

3.3 Klorovodikova kislina 3N.

3.4 Filtrirna sredstva, npr. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **Aparatura**

4.1 Naprava za ekstrakcijo. Če je opremljena s sesalno natego (naprava Soxhlet), mora biti stopnja povratnega toka takšna, da proizvede okrog 10 ciklov na uro; če pa ni opremljena z natego, mora biti stopnja povratnega toka okrog 10 ml na minuto.

4.2 Ekstrakcijske posodice iz materiala, ki ni topen v petroletru, in njihova poroznost ustreza zahtevam iz točke 4.1.

4.3 Sušilna peč; bodisi vakuumaska peč, nastavljena na  $75 \pm 3$  °C, ali peč z vročim zrakom, nastavljena na  $100 \pm 3$  °C.

5. **Postopek**5.1 *Metoda A* (glej točko 8.1)

Natehta se 5 g vzorca na 1 mg natančno, nato se prenese v ekstrakcijsko posodico (4.2) in prekrije z nemastnim zamaškom iz surovega bombaža.

Kupica se postavi v ekstraktor (4.1), kjer poteka šesturna ekstrakcija s petroletrom (3.1). Ekstrakt petroletra se prenese v suho merilno bučo, ki vsebuje drobce plovca (1).

Topilo se destilira. Ostanek izhlapevanja se posuši tako, da se buča pusti poldruho uro v sušilni peči (4.3). Nato se ohladi v eksikatorju in stehta. Spet se suši 30 minut, da ostane teža olj in masti konstantna (izguba teže med dvema zaporednima tehtanjema ne sme presežati 1 mg).

## 5.2 Metoda B

Stehta se 2,5 g vzorca na 1 mg natančno (glej točko 8.2), prenese v 400-mililitrsko čašo ali v 300-mililitrsko erlenmajerico ter dodajo 100 ml klorovodikove kisline 3N (3.3) in drobci plovca. Čaša se prekrije z armiranim steklom ali pa se erlenmajerica opremi s kondenzatorjem povratnega toka. Mešanica se postavi na nizek plamen ali na vročo ploščo, kjer eno uro rahlo vre. Pazi se, da se mešanica ne sprijema na stene posode.

Nato se ohladi in doda se toliko sredstva za filtriranje (3.4), da med filtracijo ne pride do izgube olja in masti. Mešanica se filtrira skozi navlažen, nemasten, dvojni filtrirni papir. Ostanek se opere v mrzli vodi, dokler se ne dobi nevtralni filtrat. Preveri se, da filtrat ne vsebuje ne olja ne masti. Vsebnost olj ali masti pomeni, da je treba vzorec z metodo A pred hidrolizo ekstrahirati s petroletrom.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je ostanek, se namesti na armirano steklo in poldrugo uro suši v peči pri  $100 \pm 3$  °C.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je suhi ostanek, se postavi v ekstrakcijsko posodico (4.2) in prekrije z nemastnim zamaškom iz surovega bombaža. Kupica se postavi v ekstraktor (4.1) in nadaljuje skladno z drugim in tretjim odstavkom točke 5.1.

## 6. Prikaz rezultata

Teža ostanka se izrazi v odstotkih od vzorca.

## 7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, ki ju na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

- 0,2 %, v absolutni vrednosti, za vsebnosti neprečiščenih olj in masti, nižje od 5 %,
- 4,0 % glede na največjo vrednost za vsebnosti od 5 do 10 %,
- 0,4 % v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 10 %.

## 8. Opombe

- 8.1 Za proizvode z visoko vsebnostjo olj in masti, ki jih je težko drobiti ali so neprimerni za jemanje manjših homogenih vzorcev, je postopek naslednji.

Stehta se 20 g vzorca na 1 mg natančno in zmeša z 10 g ali več brezvodnega natrijevega sulfata (3.2). S petroletrom (3.1) se izvede ekstrakcija, kakor navaja točka 5.1. Količina dobljenega ekstrakta se s petroletrom (3.1) poveča na 500 ml in homogenizira. 50 ml raztopine se prenese v majhno, suho tarirno bučo, ki vsebuje drobce plovca <sup>(1)</sup>. Topilo se destilira, osuši in postopek se nadaljuje, kakor je navedeno v zadnjem odstavku točke 5.1.

Topilo se odstrani iz ostanka ekstrakcije v posodici, ostanek se zdrobi do velikosti 1 mm in ponovno prenese v ekstrakcijsko posodico (ne sme se dodajati natrijev sulfat). Nadaljuje se, kakor je navedeno v drugem in tretjem odstavku točke 5.1.

Z naslednjo enačbo se izmeri vsebnost olj in masti v odstotkih od vzorca:

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

kjer je:

a = masa ostanka (v gramih) po prvi ekstrakciji (aliquotni delež ekstrakta),

b = masa ostanka (v gramih) po drugi ekstrakciji.

- 8.2 Pri proizvodih z nizko vsebnostjo olj in masti se preskusni vzorec lahko poveča na 5 g.

<sup>(1)</sup> Kadar je treba naknadno preverjati kakovost olj in masti, se drobci plovca nadomestijo s steklenimi zrnci.“

## PRILOGA II

## „5. Določanje vsebnosti virginiamicina

– z difuzijo na agarskem gojišču –

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo se določa vsebnost virginiamicina v krmi in premiksih. Spodnja meja določanja je 2 mg/kg (2 ppm) <sup>(1)</sup>.

2. **Princip**

Vzorec se ekstrahira z metanolno raztopino Tween 80. Ekstrakt se oddekantira ali centrifugira in razredči. Njegova antibiotska aktivnost se določi tako, da se izmeri difuzija virginiamicina na agarskem gojišču, ki je nacepljen z *Micrococcus luteus*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premosorazmeren logaritmu koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

3. **Mikroorganizem: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**3.1 *Vzdrževanje osnovne kulture*

Epruvete s poševnimi nanosi gojišča (4.1) se nacepijo z *Micrococcus luteus* in inkubirajo 24 ur pri 30 °C. Kultura se hrani v hladilniku pri 4 °C. Vsakih štirinajst dni se precepi.

3.2 *Priprava suspenzije bakterij* <sup>(a)</sup>

Z 2 do 3 ml raztopine natrijevega klorida (4.3) se posname prirastek z agarskega gojišča (3.1). S to suspenzijo se nacepi 250 ml gojišča (4.1), ki se nahaja v Rouxovi steklenici, in se inkubira od 18 do 20 ur pri 30 °C. Kultura se posname v 25 ml natrijevega klorida (4.3) in premeša. Suspenzija se z raztopino natrijevega klorida (4.3) razredči na 1/10. Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti okrog 75 %, izmerjena pri 650 nm v 1-centimetrski kivetki, proti raztopini natrijevega klorida (4.3). Suspenzija je obstojna en teden pri približno 4 °C.

4. **Gojišča in reagenti**4.1 *Gojišča kulture in preskusna gojišča* <sup>(b)</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaciji).	

4.2 *Fosfatni puffer, pH 6*

Kalijev hidrogenfosfat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Kalijev dihidrogenfosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0 g
Voda do	1 000 ml

## 4.3 Raztopina natrijevega klorida 0,8 % (m/v): v vodi se raztopi 8 g natrijevega klorida in razredči na 1 000 ml; nato se sterilizira.

## 4.4 Metanol.

## 4.5 Mešanica fosfatnega pufra (4.2)/metanola (4.4): 80/20 (v/v).

## 4.6 Metanolna raztopina Tween 80 0,5 % (m/v): 5 g Tween 80 se raztopi v metanolu (4.4) in razredči z metanolom do 1 000 ml.

## 4.7 Standardna substanca: virginiamicin z znano aktivnostjo.

## 5. Standardne raztopine

Točno natehtana količina standardne substance (4.7) se raztopi v metanolu (4.4) in razredči z metanolom (4.4), da se dobi osnovna raztopina, ki vsebuje 1 000 µg virginiamicina na ml.

Raztopina je stabilna do pet dni, če se hrani v zaprti posodi pri 4 °C.

Z zaporednim razredčevanjem z mešanico (4.5) se iz te osnovne raztopine pripravijo naslednje raztopine:

$s_8$	1	µg/ml
$s_4$	0,5	µg/ml
$s_2$	0,25	µg/ml
$s_1$	0,125	µg/ml

## 6. Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin

### 6.1 Ekstrakcija

#### 6.1.1 Proizvodi z vsebnostjo virginiamicina do 100 mg/kg

Natehta se 50 g vzorca, doda 200 ml raztopine (4.6) in stresa 30 minut. Pusti se, da se mešanica usede, ali centrifugira, nato se odpipetira 20 ml bistre raztopine nad usedlino in pusti, da izpari do približno 5 ml v rotacijskem uparjalniku pri temperaturi, ki ne presega 40 °C. Ostanek se razredči z mešanico (4.5), da se dobi pričakovana vsebnost virginiamicina 1 µg/ml (=  $u_8$ ).

#### 6.1.2 Proizvodi z vsebnostjo virginiamicina, ki presega 100 mg/kg

Natehta se količina vzorca, ki ne presega 10,0 g in vsebuje od 1 do 50 mg virginiamicina, doda se 100 ml raztopine (4.6) in stresa 30 minut. Pusti se, da se mešanica usede, ali se centrifugira, nato se bistra raztopina nad usedlino razredči z mešanico (4.5), da se dobi pričakovana vsebnost virginiamicina 1 µg/ml (=  $u_1$ ).

### 6.2 Preskusne raztopine

Z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z mešanico (4.5) se iz raztopine  $u_8$  pripravijo raztopine  $u_4$  (pričakovana vsebnost: 0,5 µg/ml),  $u_2$  (pričakovana vsebnost: 0,25 µg/ml),  $u_1$  (pričakovana vsebnost: 0,125 µg/ml).

## 7. Postopek preskusa

### 7.1 Nacepljenje preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.1) se nacepi s suspenzijo bakterij (3.2) pri približno 50 °C. S predhodnimi preskusi na ploščah z gojiščem (4.1) se določi količina suspenzije bakterij, ki je potrebna za nastanek največjih in najbistrejših inhibicijskih con z različnimi koncentracijami virginiamicina.

### 7.2 Priprava plošč

Difuzija skozi agar se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine ( $s_8$ ,  $s_4$ ,  $s_2$  in  $s_1$ ) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine ( $u_8$ ,  $u_4$ ,  $u_2$  in  $u_1$ ). Na vsako ploščo je treba nujno nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine. V ta namen se izberejo plošče, ki so dovolj velike za najmanj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm z razdaljo najmanj 30 mm med središči, ki jih je treba vdolbsti v agarско gojišče. Preskus se lahko izvaja na steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike s premerom 200 mm in višino 20 mm.

Na plošče se nanese določena količina gojišča (4.1), ki je nacepljeno skladno s točko 7.1, da se dobi približno 2 mm debela plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počaka se, da se površina utrdi. Nato se izdolbejo vdolbine in vanje se nanesejo natanko odmerjeni volumni preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, odvisno od premera). Vsaka koncentracija se uporabi najmanj štirikrat, tako da se pri vsakem preskusu ovrednoti 32 inhibicijskih con.

### 7.3 Inkubacija

Plošče se inkubirajo od 16 do 18 ur pri  $30 \pm 2$  °C.

## 8. Vrednotenje

Premer inhibicijskih con se izmeri s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo se vnesejo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premerov inhibicijskih con. Na diagramu se izrišeta premici z najboljšim potekom, tako za standardno raztopino kot tudi za ekstrakt, kakor je navedeno na primeru spodaj:

„Najboljša“ točka za najmanjšo vrednost standarda (SL) se določi po enačbi:

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

„Najboljša“ točka za največjo vrednost standarda (SH) se določi po enačbi:

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

Na podoben način se izračunata „najboljši“ točki za najmanjšo (UL) in največjo (UH) vrednost ekstrakta, in sicer tako, da se  $u_1$ ,  $u_2$ ,  $u_4$  in  $u_8$  v zgornjih enačbah zamenjajo s  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $s_4$  in  $s_8$ .

Izračunani vrednosti SL in SH se vneseta na isti diagram in povežeta, da se dobi premica z „najboljšim“ potekom za standardno raztopino. Na podoben način se vneseta vrednosti UL in UH ter povežeta, da se dobi premica z „najboljšim“ potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, morata biti premici vzporedni. Iz praktičnih razlogov se premici lahko štejeta za vzporedni, če se vrednosti (SH-SL) ter (UH-UL) ne razlikujejo za več kot 10 % od njihove srednje vrednosti.

Če premici nista vzporedni, se lahko izločita bodisi  $u_1$  in  $s_1$  ali  $u_8$  in  $s_8$ , in se vrednosti SL, SH, UL in UH izračunajo z alternativnima enačbama, s katerima se dobita alternativni premici z „najboljšim“ potekom:

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

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

in podobno velja tudi za UL in UH. Tudi v tem primeru veljajo ista merila za vzporednost. Če je bil rezultat izračunan s tremi vrednostmi, je treba to navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da sta premici vzporedni, se izračuna logaritem relativne aktivnosti ( $\log A$ ), in sicer z eno od naslednjih enačb, odvisno od tega, ali so bile za oceno vzporednosti uporabljene tri ali štiri vrednosti.

*Za štiri vrednosti*

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

*Za tri vrednosti*

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

ali

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

Aktivnost ekstrakta vzorca = aktivnost ustreznega standarda  $\times A$

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Če relativna aktivnost presega območje od 0,5 do 2,0, se preskus ponovi tako, da se ustrezno prilagodijo koncentracije ekstrakta, ali če to ni mogoče, prilagodijo standardne raztopine. Kadar relativne aktivnosti ni mogoče privedi do zahtevanega območja, je treba vsak dobljeni rezultat obravnavati kot približek in to tudi navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da premici nista vzporedni, se določanje ponovi. Če vzporednost še vedno ni dosežena, se določanje šteje za nezadovoljivo.

Rezultat se izrazi v milligramih virginiamicina na kilogram krme.

**9. Ponovljivost**

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presehati:

- 2 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti virginiamicina do 10 mg/kg,
- 20 % glede na največjo vrednost za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % glede na največjo vrednost za vsebnosti nad 50 mg/kg.

<sup>(1)</sup> 1 mg virginiamicina je enako 1 000 enotam UK.

<sup>(2)</sup> Uporabijo se lahko tudi drugi načini, če je ugotovljeno, da omogočajo podobne suspenzije bakterij.

<sup>(3)</sup> Uporabi se lahko katero koli drugo komercialno gojišče, ki je podobne sestave in daje enake rezultate.”

## PRILOGA III

## „1. DOLOČANJE VSEBNOSTI CINK BACITRACINA

— z difuzijo na agarskem gojišču —

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo se določa vsebnost cink bacitracina v krmi in premiksih. Spodnja meja določanje je 5 mg/kg (5 ppm) <sup>(1)</sup>.

2. **Princip**

Vzorec se ekstrahira pri pH 2 z mešanico metanol/voda/klorovodikova kislina in raztopine natrijevega sulfida. Natrijev sulfid se doda zato, da se oborijo topne bakrove soli, ki bi sicer lahko motile preskus. Ekstrakt se naravnava do vrednosti pH 6,5, koncentrira (kjer je potrebno) in razredči. Njegova antibiotična aktivnost se določi tako, da se izmeri difuzija cink bacitracina v agarskem gojišču, ki je nacepljeno z *Micrococcus luteus* (*flavus*). Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premosorazmeren logaritmu koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

3. **Mikroorganizem: *Micrococcus luteus* (*flavus*) ATCC 10240**3.1 *Vzdrževanje osnovne kulture*

Epruvete s poševnimi nanosi gojišča (4.1) se nacepijo z *Micrococcus luteus* (*flavus*) in inkubirajo 24 ur pri 30 °C. Kultura se hrani v hladilniku pri 4 °C. Vsakih štirinajst dni se precepi.

3.2 *Priprava suspenzije bakterij* <sup>(a)</sup>

Z 2 do 3 ml raztopine natrijevega klorida (4.3) se posname prirastek z agarskega nanosa (3.1). S to suspenzijo se nacepi 250 ml gojišča (4.1), ki se nahaja v Rouxovi steklenici, in se inkubira od 18 do 20 ur pri 30 °C. Kultura se posname v 25 ml natrijevega klorida (4.3) in premeša. Suspenzija se z raztopino natrijevega klorida (4.3) razredči na 1/10. Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti 75 %, izmerjena pri 650 nm v 1-centimetrski kivetki, proti raztopini natrijevega klorida (4.3). Suspenzija je obstojna en teden pri približno 4 °C.

4. **Gojišča kulture in reagenti**4.1 *Gojišče* <sup>(b)</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 do 6,6 (po sterilizaciji).	

4.2 *Preskusno gojišče* <sup>(b)</sup>

Tripton	10,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Tween 80	1 ml
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaciji).	

## 4.3 Raztopina natrijevega klorida 0,8 % (m/v): v vodi se raztopi 8 g natrijevega klorida in razredči do 1 000 ml; nato se sterilizira.

## 4.4 Mešanica metanol/voda in klorovodikove kisline (4.6):

80/17,5/2,5 (v/v/v).



## 4.5 Fosfatni pufer, pH 6,5:

Kalijev hidrogenfosfat, $K_2HPO_4$	22,15 g.
Kalijev dihidrogenfosfat, $KH_2PO_4$	27,85 g.
Voda do	1 000 ml.

## 4.6 Klorovodikova kislina (d: od 1,18 do 1,19).

## 4.7 Klorovodikova kislina (0,1 M).

## 4.8 Raztopina natrijevega hidroksida 1 M.

## 4.9 Raztopina natrijevega sulfida 0,5 M.

## 4.10 Bromkrezol rdeče, raztopina 0,04 % (m/v): 0,1 g bromkrezol rdečega se raztopi v 18,5 ml raztopine natrijevega hidroksida 0,01 M. Dopolni se z vodo do 250 ml in premeša.

## 4.11 Standardna substanca: cink bacitracin z znano aktivnostjo (v mednarodnih enotah).

## 5. Standardne raztopine

Natehta se določena količina standardnega cink bacitracina (4.11), ki ustreza 1 050 mednarodnim enotam (glede na navedeno aktivnost). Doda se 5 ml klorovodikove kisline 0,1 M (4.7) in pusti stati 15 minut. Doda se 30 ml vode, s fosfatnim pufrom (4.5) (približno 4 ml) se vrednost pH naravna na 4,5, nato se z vodo dopolni do 50 ml in dobro premeša (1 ml = 21 i.u., mednarodnih enot).

Z zaporednim razredčevanjem s fosfatnim pufrom (4.5) se iz te raztopine pripravijo naslednje raztopine:

$s_8$	0,42	i.u./ml
$s_4$	0,21	i.u./ml
$s_2$	0,105	i.u./ml
$s_1$	0,0525	i.u./ml

## 6. Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin

## 6.1 Ekstrakcija

## 6.1.1 Premiksi in mineralna krma

Natehta se od 2,0 do 5,0 g vzorca, dodata se 29,0 ml mešanice (4.4) in 1,0 ml raztopine natrijevega sulfida (4.9) ter na hitro pretrese. Preveri se, da je vrednost pH približno 2. Nato se stresa 10 minut, doda 30 ml fosfatnega puфра (4.5), stresa 15 minut in centrifugira. Odpipetira se ustrezen alikvot bistre raztopine nad usedlino in z 1 M raztopino hidroksida (4.8) se vrednost pH naravna na 6,5, pri čemer kot indikator služi bodisi pH-meter bodisi raztopina bromkrezol rdečega (4.10). Mešanica se razredči s fosfatnim pufrom (4.5), da se dobi pričakovana vsebnost cink bacitracina 0,42 i.u./ml (=  $u_8$ ).

## 6.1.2 Beljakovinski koncentradi

Natehta se 10,0 g vzorca, dodata se 49,0 ml mešanice (4.4) in 1,0 ml raztopine natrijevega sulfida (4.9) ter na hitro pretrese. Preveri se, da je pH vrednost približno 2, in stresa 10 minut. Doda se 50 ml fosfatnega puфра (4.5), stresa 15 minut in centrifugira. Odpipetira se ustrezen volumen bistre raztopine nad usedlino in z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida 1 M (4.8) se vrednost pH naravna na 6,5, pri čemer kot indikator služi bodisi pH-meter bodisi raztopina bromkrezol rdečega (4.10). V rotacijskem uparjalniku se upari približno polovica volumna pri temperaturi, ki ne presega 35 °C.

Razredči se s fosfatnim pufrom (4.5), da se dobi pričakovana vsebnost cink bacitracina 0,42 i.u./ml (=  $u_8$ ).

## 6.1.3 Druga krma

Natehta se 10,0 g vzorca (20,0 g za pričakovano vsebnost cink bacitracina 5 mg/kg). Dodata se 24,0 ml mešanice (4.4) in 1,0 ml raztopine natrijevega sulfida (4.9) ter 10 minut meša. Doda se 25 ml fosfatnega puфра (4.5), stresa 15 minut in centrifugira. Odpipetira se 20 ml bistre raztopine nad usedlino in z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida 1 M (4.8) se vrednost pH naravna na 6,5, pri čemer kot indikator služi bodisi pH-meter bodisi raztopina bromkrezol rdečega (4.10). V rotacijskem uparjalniku se upari do 4 ml pri temperaturi, ki ne presega 35 °C. Ostanek se razredči s fosfatnim pufrom (4.5), da se dobi pričakovana vsebnost cink bacitracina 0,42 i.u./ml (=  $u_8$ ).

## 6.2 Preskusne raztopine

Z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) s fosfatnim pufrom (4.5) se iz raztopine  $u_8$  pripravijo raztopine  $u_4$  (pričakovana vsebnost: 0,21 i.u./ml),  $u_2$  (pričakovana vsebnost: 0,105 i.u./ml), in  $u_1$  (pričakovana vsebnost: 0,0525 i.u./ml).

## 7. Preskusni postopek

### 7.1 Nacepljenje preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.2) se nacepi s suspenzijo bakterij (3.2) pri približno 50 °C. S predhodnimi preskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.2) se določi količina suspenzije bakterij, ki je potrebna, da se dobijo največje in najbistrejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami cink bacitracina.

### 7.2 Priprava plošč

Difuzija skozi agar se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine ( $s_8, s_4, s_2$  in  $s_1$ ) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine ( $u_8, u_4, u_2$  in  $u_1$ ). Na vsako ploščo je treba nujno nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine. V ta namen se zberejo plošče, ki so dovolj velike za najmanj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm in z razdaljo najmanj 30 mm med središči, ki jih je treba vdolbsti v agarско gojišče. Preskus se lahko izvaja na steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike s premera 200 mm in višino 20 mm.

Na plošče se nanese določena količina gojišča (4.2), ki je nacepljeno skladno s točko 7.1, da se dobi približno 2 mm debela plast (60 ml za ploščo s premerom 200). Počaka se, da se površina utrdi. Nato se izdolbejo vdolbine in vanje nanesejo natanko odmerjeni volumni preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, odvisno od premera). Vsaka koncentracija se uporabi najmanj štirikrat, tako da se pri vsakem preskusu ovrednoti 32 inhibicijskih con.

### 7.3 Inkubacija

Plošče se inkubirajo od 16 do 18 ur pri  $30 \pm 2$  °C.

## 8. Vrednotenje

Premer inhibicijskih con se izmeri s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo se vnesejo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premerov inhibicijskih con. Na diagramu se izrišeta premici z najboljšim potekom, tako za standardno raztopino kot tudi za ekstrakt, kakor je navedeno na primeru spodaj:

Z naslednjo enačbo se določi 'najboljša' točka za najmanjšo vrednost standardne raztopine (SL):

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

Z naslednjo enačbo se določi 'najboljša' točka za največjo vrednost standardne raztopine (SH):

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

Na podoben način se izračunata 'najboljši' točki za najmanjšo (UL) in največjo (UH) vrednost ekstrakta, in sicer tako, da se  $u_1, u_2, u_4$  in  $u_8$  v zgornjih enačbah zamenjajo s  $s_1, s_2, s_4$  in  $s_8$ .

Izračunani vrednosti SL in SH se vnesejo v isti diagram in povežeta, da se dobi premica z 'najboljšim' potekom za standardno raztopino. Na podoben način se izračunata vrednosti UL in UH ter povežeta, da se dobi premica z 'najboljšim' potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, morata biti premici vzporedni. Iz praktičnih razlogov se premici lahko štejeta za vzporedni, če se vrednosti (SH-SL) ter (UH-UL) ne razlikujejo za več kot 10 % od njihove srednje vrednosti.

Če premici nista vzporedni, se lahko izločita bodisi  $u_1$  in  $s_1$  ali  $u_8$  in  $s_8$  in se vrednosti SL, SH, UL in UH izračunajo z alternativnima enačbama, s katerima se dobijo alternativni premici z 'najboljšim' potekom:

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

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

in podobno velja tudi za UL in UH. Tudi v tem primeru veljajo ista merila za vzporednost. Če je bil rezultat izračunan s tremi vrednostmi, je treba to navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da sta premici vzporedni, se izračuna logaritem relativne aktivnosti ( $\log A$ ), in sicer z eno od naslednjih enačb, odvisno od tega, ali so bile za oceno vzporednosti uporabljene tri ali štiri vrednosti.

Za štiri vrednosti

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

Za tri vrednosti

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

ali

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

Aktivnost ekstrakta vzorca = aktivnost ustreznega standarda  $\times A$

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Če relativna aktivnost presega območje od 0,5 do 2,0, se preskus ponovi tako, da se ustrezno prilagodijo koncentracije ekstrakta, ali če to ni mogoče, prilagodijo standardne raztopine. Kadar relativne aktivnosti ni mogoče dovesti do zahtevanega območja, je treba vsak dobljeni rezultat obravnavati kot približek in to tudi navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da premici nista vzporedni, se določanje ponovi. Če vzporednosti še vedno ni dosežena, se določanje šteje za nezadovoljivo.

Rezultat se izrazi v milligramih cink bacitracina na kilogram krme.

## 9. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

- 2 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti cink bacitracina do 10 mg/kg,
- 20 % glede na večjo vrednost za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % glede na večjo vrednost za vsebnosti nad 50 mg/kg.

<sup>(1)</sup> 1 mg cinkovega bacitracina ustreza 42 mednarodnim enotam (i.u.).

<sup>(e)</sup> Uporabijo se lahko tudi drugi postopki, če je ugotovljeno, da dajejo podobne suspenzije bakterij.

<sup>(b)</sup> Uporabi se lahko katero koli komercialno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate. "