

ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 20 декември 1983 година

за изменение на Директиви 71/393/ЕИО, 72/199/ЕИО и 78/633/ЕИО относно определяне на методи на Общността за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(84/4/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждане на методи на Общността за вземане на проби и анализ за официален контрол на храните за животни ¹, последно изменена с Акта за присъединяване на Гърция, и по-специално член 2 от този акт,

като има предвид, че Директиви 71/393/ЕИО ², 72/199/ЕИО ³ и 78/633/ЕИО ⁴ на Комисията определят методите на анализ на сурови масла и мазнини, вирджиниямицин и цинк бацитрацин; като има предвид, че е необходимо да се заменят тези методи с методи, които отразяват постиженията на научно-техническия прогрес;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

В приложението към Директива 71/393/ЕИО, част IV „Определяне на сурови масла и мазнини” се заменя с приложение I към настоящата директива.

Член 2

Приложение II към Директива 72/199/ЕИО, част 5 „Определяне на вирджиниямицин чрез дифузия в среда агар-агар” се заменя с приложение II към настоящата директива.

Член 3

¹ ОВ L 170, 3. 8.1970 г., стр. 2.

² ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.

³ ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6.

⁴ ОВ L 206, 29.7 1978 г., стр. 43.

В приложението към Директива 78/633/ЕИО, част 1 „Определяне на цинк бацитрацин чрез дифузия в среда агар-агар” се заменя с приложение III към настоящата директива.

Член 4

Държавите-членки въвеждат не по-късно от 1 юли 1984 г. законовите, подзаконови или административни разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива. Те незабавно информират за това Комисията.

Член 5

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 20 декември 1983 година.

За Комисията:
Poul DALSAGER
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

„4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВИ МАСЛА И МАЗНИНИ

1. Задача и обхват

Настоящият метод дава възможност за определяне на съдържанието на сурови масла и мазнини в храни за животни. Той не обхваща анализа на семена и плодове за добиване на масла, определени в Регламент 136/66/ЕИО на Съвета от 22 септември 1966 г.

В зависимост от характера на животинските храни, трябва да се използва един от двата описани методи.

1.1. Метод А

Приложим при храни за животни без примеси от растителен произход, с изключение на тези, за които е известно, че съдържат масла и мазнини, които не могат напълно да бъдат извлечени с петролен етер без предварителна хидролиза. Между тях са глутените, дрождите, соевите и картофените белтъчини. Настоящият метод е също така приложим за комбинирани храни за животни, с изключение на тези, които съдържат мляко на прах или от които не могат напълно да бъдат извлечени масла и мазнини с петролен етер без предварителна хидролиза.

1.2. Метод Б

Приложим при директни храни за животни от животински произход, както и при храните за животни, посочени в точка 1.1, като изключение за метод А.

2. Принцип

2.1. Метод А

Пробата се извлича с петролен етер. Разтворителят се дестилира и утайката се изсушава и измерва.

2.2. Метод Б

Пробата се обработва термично със солна киселина. Сместа се охлажда и се филтрира. След като бъде промит и изсушен, остатъкът се подлага на определяне съгласно метод А.

3. Реактиви

3.1. Петролен етер, диапазон на кипене: от 40 до 60 °C. Индексът на брома трябва да бъде по-малък от 1, а остатъкът след изпарението – по-малък от 2 mg/100 ml.

3.2. Натриев сулфат, безводен.

3.3. Солна киселина, 3N.

3.4. Филтрираща добавка, напр. инфузорна пръст, Hyflo-supercel.

4. Апаратура

4.1. Екстрактор. Ако апаратът има със сифон (Сокслетов апарат), дебитът на нагриването с обратен хладник трябва да бъде такъв, че да се получават около 10 цикъла на час; ако апаратът е без сифон, дебитът на нагриването на обратния хладник трябва да бъде около 10 ml в минута.

4.2. Екстракционни патрони свободни от разтворими вещества в петролен етер, и чиято поръзност съответства на изискванията на точка 4.1.

4.3. Сушилня или вакуумсушилня, настроена на 75 ± 3 °C или въздушна пещ, настроена на 100 ± 3 °C.

5. Процедура

5.1. *Метод А* (вж. точка 8.1)

Претеглят се 5 g от пробата с точност 1 mg, прехвърлят се в екстракционен патрон (4.2) и се покриват с памучен обезмаслен тампон.

Патронът се поставя в екстрактор (4.1), и се извлича в продължение на шест часа с петролен етер (3.1). Екстрактът се събира в суха претеглена колба, която съдържа късчета пемза¹.

Чрез дестилация се отстранява разтворителят. Остатъкът се изсушава, като колбата се държи в продължение на един час и половина в сушилня (4.3). Остава се да се охлади в сушилен шкаф и се претегля. Изсушава се отново в продължение на 30 минути, за да се гарантира, че теглото на маслата и мазнините ще остане постоянно (загубата на тегло между две последователни претегляния трябва да бъде по-малка от 1 mg).

5.2. *Метод Б*

Претеглят се 2,5 g от пробата с точност 1 mg, (вж. точка 8.2), поставят се в бехерова чаша 400 ml или в ерленмайерова колба 300 ml и се добавят 100 ml солна киселина 3N (3.3) и късчета пемза. Бехеровата чаша се покрива с наблюдателно стъкло или се слага към коничната колба се свързва обратен хладник. Сместа се нагрива до слабо кипене на слаб пламък или на котлон и така се държи в продължение на един час. Следи се продуктът да не залепне по стените на контейнера.

Охлажда се и се добавя достатъчно количество от филтрационната добавка (3.4), за да се предотврати всякаква загуба на масла и мазнина при

¹ Късчетата пемза се заменят със стъклени перли, когато маслата или мазнините подлежат на по-нататъшни качествени изследвания.).

филтрирането. Филтрира се през навлажнена обезмаслена двойно филтрираща хартия. Остатъкът се промива в студена вода до получаване на неутрален филтрат. Филтратът се проверява за съдържание на масла или мазнини. Тяхното наличие показва, че пробата трябва да бъде извлечена с петролен етер, като се използва метод А, преди хидролизата.

Двойната филтрираща хартия, съдържаща сухия остатък, се поставя върху наблюдателно стъкло и се суши в продължение на един час и половина в пещта при $100 \pm 3^\circ\text{C}$.

Двойната филтрираща хартия се поставя в екстракционен патрон (4.2), който се покрива с памучен обезмаслен тампон. Патронът се поставя в екстрактора (4.1) и се продължава, както е посочено във втори и трети параграф от точка 5.1.

6. Изразяване на резултатите

Теглото на остатъка се изразява като процент от пробата.

7. Повторяемост

Разликата между резултатите на две паралелни определяния, извършени на същата проба от един и същ лаборант, не трябва да превишава:

- 0,2 % в абсолютна стойност, за съдържание на сурови масла и мазнини по-ниски от 5 %,
- 4,0 % по отношение на най-високия резултат за съдържания от 5 до 10 %,
- 0,4 % в абсолютна стойност, за съдържания над 10 %.

8. Наблюдения

8.1. При продукти с високо съдържание на масла и мазнини, които е трудно да се строят или са неподходящи за изтегляне на хомогенна редуцирана проба за изпитване, се процедира, както следва.

Претеглят се 20 g от пробата с точност 1 mg и се смесват с 10 g или повече безводен натриев сулфат (3.2). С петролен етер (3.1) се извлича, както е посочено в точка 5.1. Полученият екстракт се долива до 500 ml с петролен етер (3.1) и се хомогенизира. Вземат се 50 ml от разтвора и се поставят в малка суха претеглена колба, която съдържа парчета пемза¹. Разтворителят се отстранява чрез дестилиране, изсушава се и се продължава, както е посочено в последния параграф на точка 5.1.

Разтворителят се отстранява от остатъка от екстракцията, останал в патрона, остатъкът се строшава до едрина на частиците 1 mm, връща се в

¹ Късчетата пемза се заменят със стъклени перли, когато маслата или мазнините подлежат на по-нататъшни качествени изследвания.).

екстракционния патрон (без да се добавя натриев сулфат) и се продължава, както е посочено във втори и трети параграф от точка 5.1.

Съдържанието на масла и мазнини се изчислява като процент от пробата, като се използва следната формула:

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

където:

a = масата в грамове на остатъка след първата екстракция (аликватна част на екстракта),

b = масата в грамове на остатъка след втората екстракция.

- 8.2. При продукти, които имат ниско съдържание на масла и мазнини пробата за изпитване може да се увеличи до 5 ”

ПРИЛОЖЕНИЕ II

„5. Определяне на вирджиниямицин

- чрез дифузия в среда агар – агар -

1. Задача и обхват

Методът е за определяне на вирджиниямицин във храни за животни и премикси. Долната граница на определяне е 2 mg/kg (2 ppm)¹.

2. Принцип

Пробата се екстрахира с метанолов разтвор Tween 80. Екстрактът се декантира или центрофугира и се разрежда. Неговата антибиотична активност се определя чрез измерване дифузията на вирджиниямицина в агарова среда, засята с *Micrococcus luteus*. Дифузията става видима по образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони се счита за правопрпорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика в обхвата на изследваните антибиотични концентрации.

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

3.1. Поддържане на щама

Инокулира се епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1) с *Micrococcus luteus* и се инкубира в течение на 24 часа при 30°C. Културата се съхранява в хладилник при 4°C. Реинокулира се на всеки две седмици.

3.2. Приготвяне на бактериалната суспензия^(a)

Бактериите се събират от наскоро приготвена епруветка скосен агар (3.1) с 2 до 3 ml разтвор на натриев хлорид (4.3). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 250 ml хранителна среда (4.1) и се култивира в продължение на 18 до 20 часа при 30 °C. Бактериите се събират в 25 ml разтвор на натриев хлорид (4.3) и се хомогенизира. Суспензията се разрежда до 1/10 с разтвор на натриев хлорид (4.3). Пропускливостта на светлината на суспензията трябва да бъде около 75 %, измерена при 650 nm в клетка 1 cm спрямо разтвор на натриев хлорид (4.3). Тази суспензия може да се съхранява една седмица при около 4 °C.

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. Хранителна и изпитателна среда^(b)

¹ 1 mg вирджиниямицин е еквивалентен на 1 000 UK единици.

^(a) Могат да се използват други методи, при условие че е установено, че те дават подобни бактериални суспензии.

Месен пептон	6,0 g
Триптон	4,0 g
Дрождиев екстракт	3,0 g
Месен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Вода	1 000 ml
РН 6,5 (след стерилизация).	

4.2. *Фосфатен буфер, рН 6*

Монокалиев фосфат, K_2HPO_4	2,0 g
Дикалиев фосфат, KH_2PO_4	8 g
Вода до	1 000 ml

4.3. Разтвор на натриев хлорид 0,8 % (w/v): разтваря се 8 g натриев хлорид във вода и се разрежда до 1 000 ml; се стерилизира.

4.4. Метанол.

4.5. Смес от разтвор на фосфатен буфер (4.2)/метанол (4.4): 80/20 по обем.

4.6. Метанолов разтвор на Tween 80, 05 % (w/v): разтваря се 5 g Tween 80 в метанол (4.4) и се разрежда с метанол до 1 000 ml.

4.7. Стандартна субстанция: вирджиниямицин с известна активност.

5. Стандартни разтвори

Разтваря се точно претеглено количество стандартна субстанция (4.7) в метанол (4.4) и се разрежда с метанол (4.4), за да се получи изходен разтвор, съдържащ 1 000 mg вирджиниямицин на 1 ml.

Когато се съхранява в запушена колба при 4°C, този разтвор е стабилен до пет дни.

От този изходен разтвор се приготвят чрез последващо разреждане със сместа (4.5) следните разтвори:

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

⁽⁶⁾ Може да се използва всяка комерсиална хранителна среда с подобен състав и даващи същите резултати.

6. Приготвяне на екстракта и разтворите за изпитване

6.1. Екстракция

6.1.1. Продукти със съдържание на вирджиниямицин до 100 mg/kg

Взема се 50 g от пробата, добавя се 200 ml разтвор (4.6) и се разтръсква в продължение на 30 минути. Остава се да се утаи или се центрофугира, вземат се 20 ml от плаващия отгоре разтвор и изпарете до около 5 ml в ротационен изпарител при температура, която не превишава 40°C. Разрежете утайката със сместа (4.5), за да се получи очакваното съдържание на вирджиниямицин от 1 mg/ml (=u₈).

6.1.2. Продукти със съдържание на вирджиниямицин по-голямо от 100 mg/kg

Взема се проба количество, което не превишава 10,0 g и съдържа между 1 и 50 mg вирджиниямицин, добавя се 100 ml разтвор (4.6) и се разтръсква в продължение на 30 минути. Остава се да се утаи или се центрофугира, след което се разрежда плаващия отгоре разтвор със сместа (4.5), за да се получи очакваното съдържание на вирджиниямицин от 1 mg/ml (=u₈).

6.2. Разтвори за изпитване

От разтвор u₈ се приготвя разтвор u₄ (очаквано съдържание: 0,5 mg), u₂ (очаквано съдържание: 0,25 mg) и u₁ (очаквано съдържание: 0,125 mg) чрез последователно разреждане (1 + 1) със сместа (4.5).

7. Процедура на определяне

7.1. Инокулиране на хранителната среда

Хранителната среда (4.1) се инокулира с бактериалната суспензия (3.2) при около 50°C. Чрез предварителни опити в петри със среда (4.1) определете количеството на бактериалната суспензия, което се изисква, за да се получат най-големи и ясни зони на инхибиране с различните концентрации на вирджиниямицин.

7.2. Подготовка на паничките

Дифузията в агар се провежда в панички, като се използват четири концентрации на стандартния разтвор (s₈, s₄, s₂, и s₁) и четири концентрации на екстракта (u₈, u₄, u₂, и u₁). Тези четири концентрации на екстракта и стандартът е необходимо да се поставят във всяка паничка. За тази цел изберете панички достатъчно големи да позволят да се направят в агарова среда най-малко осем дупки с диаметър от 10 до 13 mm и не по-малко от 30 mm между центровете. Тестът може да се извърши на паничките, които се състоят от стъклен лист с поставени върху него алуминиеви или пластмасови пръстени с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

Излива се в паничката част от средата (4.1), инокулирана както е указано в точка 7.1, за да се получи пласт дебел около 2 мм (60 мл за панички с диаметър 200 мм). Остава се да се разстеле равномерно, пробиват се дупки и в тях се поставят точно премерени обеми от изпитваните и стандартните разтвори (между 0,10 и 0,15 мл на дупка, в зависимост от диаметъра). За всяка проба разрежданията се повтарят най-малко четири пъти с всяка концентрация, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. *Инкубиране*

Паничките се инкубират от 16 до 18 часа при 30 ± 2 °C.

8. Оценяване

За предпочитане е диаметърът на зоните на инхибиране да се измери с точност до 0,1 мм. Записват се средните аритметични стойности на измерванията за всяка концентрация милиметрова хартия, която показва логаритъма на концентрациите спрямо диаметрите на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на най-добро съвпадане на стандартния разтвор и екстракта, например както по-долу:

Определя се точката на „най-добро съвпадане” за най-ниското ниво на стандарта (SL), като се използва формулата:

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

Определя се точката на „най-добро съвпадане” за най-високото ниво на стандарта (SH), като се използва формулата:

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

По същия начин се изчисляват точките на „най-добро съвпадане” за най-ниското ниво на екстракта (UL) и най-високото ниво на екстракта (UH), като се заместят u_8 , u_4 , u_2 , и u_1 и s_8 , s_4 , s_2 , и s_1 в горните формули.

Отбелязват се изчислените стойности на SL и SH на същата милиметрова хартия и се съединяват, за да получи линията на „най-добро съвпадане” за стандартния разтвор. По същия начин се отбелязват UL и UH и се съединяват, за да се получи линията на „най-добро съвпадане” за екстракта.

При отсъствие на външни влияния линиите трябва да бъдат успоредни. За практични цели линиите могат да се считат успоредни, ако стойностите (SH – SL) и (UH – UL) не се различават с повече от 10 % от тяхната средна аритметична стойност.

Ако линиите не са успоредни, могат да се изключат или u_1 и u_8 , или s_1 и s_8 , и да изчислят SL, SH, UL и UH, като се използват алтернативните формули, за да се получат линиите на „най-добро съвпадане”:

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

$$б'') SH = (5s_8 + 2s_4 - s_2)/6 \quad \text{или} \quad (5s_4 + 2s_2 - s_1)/6$$

и по-същия начин за UL и UH. Трябва да бъде удовлетворен същия критерий за успоредност. Фактът, че резултатът е бил изчислен от три нива, трябва да бъде отбелязан в крайния отчет.

Когато линиите се считат за успоредни, изчислете логаритъма на относителната активност ($\log A$) чрез една от следните формули, в зависимост от това дали за оценка на успоредността са били използвани четири или три нива.

За четири нива

$$в) \log A = (u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602 / (u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2)$$

За три нива

$$г) \log A = (u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401 / (u_4 + s_4 + s_8 - u_1 - s_1)$$

или

$$г'') \log A = (u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401 / (u_8 + s_8 - u_2 - s_2)$$

Активността на екстракта от пробата = активността съответния стандарт $\times A$

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

Ако се установи, че относителната активност е извън обхвата 0,5 до 2,0, повторете изпитанието, като направите подходящи корекции на концентрациите на екстракта или, ако това не е възможно, на стандартните разтвори. Когато относителната активност не може да бъде вкарана в изисквания обхват, всеки получен резултат трябва да се счита за приблизителен и това трябва да бъде отбелязано в крайния отчет.

Когато се счита, че линиите не са успоредни, определянето се повтаря. Ако и тогава не се постига успоредност, определянето трябва да се счита за незадоволително.

Резултатът се изразява в милиграми вирджиниямицин на килограм храни за животни.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите на две паралелни определяния, проведени с една и съща проба от същия лаборант не трябва да превишават:

- 2 mg/kg в абсолютна стойност, за съдържание на вирджиниямицин до 10 mg/kg,
- 20 % спрямо най-високата стойност за съдържания от 10 до 25 mg/kg,
- 5 mg/kg в абсолютна стойност, за съдържание от 25 до 50 mg/kg,
- 10 % спрямо най-високата стойност за съдържания над 50 mg/kg.”

ПРИЛОЖЕНИЕ III

„1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЦИНК БАЦИТРАЦИН

- чрез дифузия в среда агар-агар –

1. Задачи и обхват

Методът служи за определяне на цинк бацитрацин във храни за животни и премикси. Долната граница на определяне е 5 mg/kg (5ppm)¹

2. Принцип

Пробата се екстрахира при рН 2 със смес на метанол/вода/солна киселина и разтвор на натриев сулфат. Натриевият сулфат се добавя, за да се утаят всички разтворими медни соли, които могат да повлияят на изпитанието. Екстрактът се довежда до рН 6,5, концентриран (когато е необходимо) и разреден. Неговата антибиотична активност се определя чрез измерване дифузията на вирджиниямицин в среда агар-агар, инокулирана с *Micrococcus luteus* (flavus). Дифузията става видима от образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони се счита за правопрпорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика в обхвата на изследваните антибиотични концентрации.

3. Микроорганизъм: *Micrococcus luteus* ATCC 10240

3.1. Поддържане на щама

Инокулира се епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1) с *Micrococcus luteus* (flavus) и се инкубира в течение на 24 часа при 30°C. Културата се съхранява в хладилник при 4°C. Реинокулира се на всеки две седмици.

3.2. Приготвяне на бактериалната суспензия^(a)

Бактериите се събират от наскоро приготвена епруветка скосен агар (3.1) с 2 до 3 мл разтвор на натриев хлорид (4.3). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 250 мл хранителна среда (4.1) и се култивира в продължение на 18 до 20 часа при 30°C. Бактериите се събират в 25 мл разтвор на натриев хлорид (4.3) и се хомогенизира. Суспензията се разрежда до 1/10 с разтвор на натриев хлорид (4.3). Пропускливостта на светлината на суспензията трябва да бъде около 75 %, измерена при 650 nm в клетка 1 cm спрямо разтвор на натриев хлорид (4.3). Тази суспензия трябва да се съхранява една седмица при около 4°C.

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. Хранителна^(б)

¹ 1 mg фуражен клас цинк бацитрацин е еквивалентен на 42 международни единици (м.е.)

^(a) Могат да се използват други методи, при условие че е установено, че те дават подобни бактериални суспензии.

Месен пептон	6,0 g
Триптон	4,0 g
Дрождиев екстракт	3,0 g
Месен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Вода	1 000 мл
РН 6,5 (след стерилизация).	

4.2. Изпитателна среда⁽⁶⁾

Триптон	10,0 g
Дождиев екстракт	3,0 g
Месен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Tween 80	1 мл
Вода	1 000 мл
РН 6,5 (след стерилизация).	

4.3. Разтвор на натриев хлорид 0,8 % (w/v): разтварят се 8 g натриев хлорид във вода и се разрежда до 1 000 мл; и се стерилизира.

4.4. Смес на метанол/вода/солна киселина (4.6):

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

4.5. Фосфатен буфер, рН 6,5:

Монокалиев фосфат, K_2HPO_4	22,15 g
Дикалиев фосфат, KH_2PO_4	27,85 g
Вода до	1 000 мл

4.6. Солна киселина (d: 1,18 до 1,19).

4.7. Солна киселина (0,1 M).

⁽⁶⁾ Може да се използва всяка комерсиална хранителна среда с подобен състав и даващи същите резултати.

⁽⁶⁾ Може да се използва всяка хранителна културална среда с подобен състав и даващи същите резултати.

4.8. Натриев хидроксид разтвор 1 М.

4.9. Натриев сулфид разтвор около 0,5 М.

4.10. Разтвор на бромокрезол, пурпурен разтвор 0,04 % (w/v): разтваря се 0,1 g пурпурен бромокрезол в 18,5 мл разтвор на натриев хидроксид 0,01 М. Добавя се обемът до 250 мл с вода и се смесва.

4.11. Стандартна субстанция: цинк бацитрацин с известна активност (в м.е.).

5. Стандартни разтвори

Разтваря се количество от стандартна субстанция (4.11), което съответства на 1 050 м.е. (съгласно посочената активност). Добавят се 5 мл солна киселина 0,1 М (4.7) и се оставят спокойно в продължение на 15 минути. Добавят се 30 мл вода, коригира се рН до 4,5 с фосфатен буфер (4.5) (около 4 мл), долива се до 50 мл с вода и се смесва добре (1 мл = 21 м.е.).

От този разтвор се приготвят чрез последователно разреждане с фосфатен буфер (4.5) следните разтвори:

S ₈	0,42	м.е./мл
S ₄	0,21	м.е./мл
S ₂	0,105	м.е./мл
S ₁	0,0525	м.е./мл

6. Приготвяне на екстракта и разтворите за изпитване

6.1. Екстракция

6.1.1. Премикси и минерални храни

Претегля се от 2,0 до 5,0 g от пробата, добавя се 29,0 мл от сместа (4.4) и 1,0 мл разтвор на натриев сулфид (4.9) и се разтръсква за кратко. Проверява се дали рН е около 2. Разтръсква се в продължение на 10 минути, добавя се 30 мл фосфатен буфер (4.5), разтръсква се в продължение на 15 минути и се центрофугира. Взема се подходящ аликват от разтвора, който плава отгоре, и рН се довежда до 6,5 с помощта на хидрооксиден разтвор 1 М (4.8) с рН метър или с разтвор на бромкрезол пурпур (4.10) като индикатор. Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин 0,42 м.е./мл (= u₈).

6.1.2. Протеинови концентрати

Претегля се 10,0 от пробата, добавя се 49,0 мл от сместа (4.4) и 1,0 мл разтвор на натриев сулфид (4.9) и се разтръсква за кратко. Проверява се дали рН е около 2. Разтръсква се в продължение на 10 минути. Добавя се 50 мл фосфатен буфер (4.5), разтръсква се в продължение на 15 минути и се центрофугира. Взема се подходящ аликват от разтвора, който плава

отгоре, и рН се довежда до 6,5 с помощта на хидроксиден разтвор 1 М (4.8) с рН метър или с разтвор на бромкрезол пурпур (4.10) като индикатор. Изпарява се до приблизително половината обем в ротационен изпарител при температура, която не превишава 35°C.

Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин 0,42 м.е./мл (= u_8).

6.1.3. Други храни

Претегля се 10,0 g от пробата (20,0 g за очаквано съдържание на цинк бацитрацин 5 mg/kg). Добавя се 24,0 мл от сместа (4.4) и 1,0 мл разтвор на натриев сулфид (4.9) и се хомогенизира в продължение на 10 минути. Добавя се 25 мл фосфатен буфер (4.5), разтръсква се в продължение на 15 минути и се центрофугира. Взема се 20 мл от разтвора, който плава отгоре, и рН се довежда до 6,5 с помощта на хидрооксиден разтвор 1 М (4.8) с рН метър или с разтвор на бромкрезол пурпур (4.10) като индикатор. Изпарява се около 4 мл в ротационен изпарител при температура, която не превишава 35°C. Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин 0,42 м.е./мл (= u_8).

6.2. Разтвори за изпитване

От разтвор u_8 пригответе разтвори u_4 (очаквано съдържание: 0,21 м.е./мл), u_2 (очаквано съдържание: 0,105 м.е./мл) и u_1 (очаквано съдържание: 0,0525 м.е./мл) чрез последователно разреждане (1 + 1) със сместа (4.5).

7. Процедура на изпитване

7.1 . Инокулиране на хранителната среда

Хранителната среда (4.2) се инокулира с бактериалната суспензия (3.2) при около 50°C. Чрез предварителни опити в петри със среда (4.2) определете количеството на бактериалната суспензия, което се изисква, за да се получат най-големи и ясни зони на инхибиране с различните концентрации на цинк бацитрацин.

7.2. Подготовка на паничките

Дифузията в агар се осъществява в панички, като се използват четири концентрации на стандартния разтвор (s_8 , s_4 , s_2 , и s_1) и четири концентрации на екстракта (u_8 , u_4 , u_2 , и u_1). Тези четири концентрации на екстракта и стандарта е необходимо да се поставят във всяка паничка. За тази цел се избират панички достатъчно големи да позволят да се направят в агарова среда най-малко осем дупки с диаметър от 10 до 13 мм и не по-малко от 30 мм между центровете. Тестът може да се извърши на панички, които се състоят от стъклен лист с поставени върху

него алуминиеви или пластмасови пръстени с диаметър 200 мм и височина 20 мм.

Излива се в паничката част от средата (4.2), инокулирана както е указано в точка 7.1, за да се получи пласт дебел около 2 мм (60 мл за панички с диаметър 200 мм). Остава се да се разстеле равномерно, пробиват се дупки и в тях се поставят точно премерени обеми от изпитваните и стандартните разтвори (между 0,10 и 0,15 мл на дупка, в зависимост от диаметъра). За всяка проба разрежданията се повтарят най-малко четири пъти с всяка концентрация, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. *Инкубиране*

Паничките се инкубират от 16 до 18 часа при 30 ± 2 °C.

8. Оценяване

За предпочитане е диаметърът на зоните на инхибиране да се измери с точност до 0,1 мм. Записват се средните аритметични стойности на измерванията за всяка концентрация на милиметрова хартия, която показва логаритъма на концентрациите спрямо диаметрите на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на най-добро съвпадане на стандартния разтвор и екстракта, например както по-долу:

Определя се точката на „най-добро съвпадане” за най-ниското ниво на стандарта (SL), като се използва формулата:

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

Определя се точката на „най-добро съвпадане” за най-високото ниво на стандарта (SH), като се използва формулата:

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

По същия начин се изчисляват точките на „най-добро съвпадане” за най-ниското ниво на екстракта (UL) и най-високото ниво на екстракта (UH), като се заместят u_8 , u_4 , u_2 , и u_1 и s_8 , s_4 , s_2 , и s_1 в горните формули.

Отбелязват се изчислените стойности на SL и SH на същата милиметрова хартия и се съединяват, за да се получи линията на „най-добро съвпадане” за стандартния разтвор. По същия начин се отбелязват UL и UH и се съединяват, за да се получи линията на „най-добро съвпадане” за екстракта.

При отсъствие на външни влияния линиите трябва да бъдат успоредни. За практични цели линиите могат да се считат успоредни, ако стойностите (SH – SL) и (UH – UL) не се различават с повече от 10 % от тяхната средна аритметична стойност.

Ако линиите не са успоредни, могат да се изключат или u_1 и u_8 , или s_1 и s_8 , и да изчислят SL, SH, UL и UH, като се използват алтернативните формули, за да се получат линиите на „най-добро съвпадане“:

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

$$б'') SH = (5s_8 + 2s_4 - s_2)/6 \quad \text{или} \quad (5s_4 + 2s_2 - s_1)/6$$

и по-същия начин за UL и UH. Трябва да бъде удовлетворен същия критерий за успоредност. Фактът, че резултатът е бил изчислен от три нива трябва да бъде отбелязан в крайния отчет.

Когато линиите се считат за успоредни, се изчислява логаритъма на относителната активност ($\log A$) чрез една от следните формули, в зависимост от това дали четири или три нива са били използвани за оценка на успоредността.

За четири нива

$$в) \log A = (u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602 / (u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2)$$

За три нива

$$г) \log A = (u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401 / (u_4 + s_4 + s_8 - u_1 - s_1)$$

или

$$г'') \log A = (u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401 / (u_8 + s_8 - u_2 - s_2)$$

Активността на екстракта от пробата = активността съответния стандарт $x A$

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

Ако се установи, че относителната активност е извън обхвата 0,5 до 2,0, изпитанието се повтаря, като се направят подходящи корекции на концентрациите на екстракта или, ако това не е възможно, на стандартните разтвори. Когато относителната активност не може да бъде вкарана в изисквания обхват, всеки получен резултат трябва да се счита за приблизителен и това трябва да бъде отбелязано в крайния отчет.

Когато се счита, че линиите не са успоредни, определянето се повтаря. Ако и тогава не се постига успоредност, определянето трябва да се счита за незадоволително.

Резултатът се изразява в милиграми бацитрацин на килограм храни за животни.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите на две паралелни определяния, проведени върху същата проба от същия лаборант не трябва да превишават:

- 2 mg/kg в абсолютна стойност, за съдържание на бацитрацин до 10 mg/kg,
- 20 % спрямо най-високата стойност за съдържание от 10 до 25 mg/kg,
- 5 mg/kg в абсолютна стойност, за съдържание от 25 до 50 mg/kg,
- 10 % спрямо най-високата стойност за съдържания над 50 mg/kg.”