Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

►**B**

TERZA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 27 aprile 1972

che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli degli alimenti per gli animali

(72/199/CEE)

(GU L 123 del 29.5.1972, pag. 6)

Modificata da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Direttiva 81/680/CEE della Commissione del 30 luglio 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Direttiva 84/4/CEE della Commissione del 20 dicembre 1983	L 15	28	18.1.1984
►**M3**	Direttiva 93/28/CEE della Commissione del 4 giugno 1993	L 179	8	22.7.1993

Rettificata da:

►**C1** Rettifica, GU L 320 del 27.11.1980, pag. 43 (72/199/CEE)

▼B

TERZA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 27 aprile 1972

che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli degli alimenti per gli animali

(72/199/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva del Consiglio, del 20 luglio 1970, concernente l'introduzione di modi di prelevamento dei campioni e di metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per gli animali ([1]), in particolare l'articolo 2,

considerando che la suddetta direttiva prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, destinati a constatare l'osservanza delle condizioni prescritte in virtù delle disposizioni legislative, regolamentari o amministrative concernenti le qualità e la composizione degli alimenti per gli animali, siano effettuati secondo i modi di prelevamento di campioni ed i metodi di analisi comunitari;

considerando che le direttive n. 71/250/CEE e n. 71/393/CEE della Commissione, del 15 giugno 1971 ([2]) e del 18 novembre 1971 ([3]), hanno già fissato un certo numero di metodi di analisi comunitari; che, tenuto conto dello stato d'avanzamento dei lavori sin qui effettuati, è necessario adottare una terza serie di metodi;

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

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, per quanto riguarda il loro contenuto in amido, proteine gregge, proteine gregge solubilizzabili con la pepsina ed acido cloridrico ed in gossipolo libero e totale e per quanto riguarda l'attività della pepsina, siano effettuate secondo i metodi descritti all'allegato I della presente direttiva.

▼M1

▼B

Articolo 2

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali in vista del rivelamento e della identificazione degli antibiotici del gruppo delle tetracicline nonché per quanto riguarda il contenuto degli alimenti in clorotetraciclina, ossitetraciclina, tetraciclina, oleandomicina, tilosina e virginiamicina, siano effettuate secondo i metodi descritti all'allegato II della presente direttiva.

▼M1

▼B

Articolo 3

Gli Stati membri curano l'entrata in vigore, al più tardi il 1° luglio 1973, delle disposizioni legislative, regolamentari o amministrative necessarie per uniformarsi alle disposizioni della presente direttiva e ne informano immediatamente la Commissione.

([1]) GU n. L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.
([2]) GU n. L 155 del 12. 7. 1971, pag. 13.
([3]) GU n. L 279 del 20. 12. 1971, pag. 7.

▼B

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

▼B

ALLEGATO I

1. DETERMINAZIONE DELL'AMIDO

— Metodo polarimetrico —

1. Scopo e campo d'applicazione

Il metodo permette di determinare il contenuto in amido ed in prodotti di degradazione dell'amido ad alto peso molecolare degli alimenti degli animali, eccettuati quelli che contengono fettucce, polpe esauste, foglie o colletti essiccati di barbabietole, polpe di patate, lieviti disidratati, prodotti ricchi di inulina (ad esempio fettucce e farina di patate dolci) o ciccioli.

2. Principio

Il metodo comprende una doppia determinazione. Nella prima, il campione è trattato a caldo con l'acido cloridrico diluito. Dopo chiarificazione e filtrazione si misura mediante polarimetria il potere rotatorio della soluzione.

Nella seconda, il campione viene estratto con etanolo al 40 %. Dopo acidificazione del filtrato con acido cloridrico, defecazione e filtrazione, si misura il potere rotatorio nelle stesse condizioni della prima determinazione.

La differenza tra le due misure, moltiplicata per un fattore noto, dà il contenuto in amido del campione.

3. Reattivi

3.1 Acido cloridrico al 25 % (p/p), d: 1,126

3.2 Acido cloridrico all'1,128 % (p/v)

La concentrazione deve essere verificata per titolazione mediante una soluzione di idrossido di sodio 0,1 N in presenza di rosso di metile allo 0,1 % (p/v) in etanolo al 94 % (v/v). ml 10 = ml 30,94 di NaOH 0,1 N.

3.3 Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua g 21,9 di acetato di zinco

$Zn\ (CH_3COO)_2 \cdot 2\ H_2O$ e g 3 di acido acetico glaciale. Completare a ml 100 con acqua.

3.4 Soluzione di Carrez II: Sciogliere in acqua g 10,6 di ferrocianuro di potassio

$K_4\ [Fe(CN)_6] \cdot 3\ H_2O$. Completare a ml 100 con acqua.

3.5 Etanolo al 40 % (v/v), d: 0,948 a 20º C.

4. Apparecchiatura

4.1 Matraccio di Erlenmeyer da ml 250 a smerigliatura unificata, con refrigerante a riflusso

4.2 Polarimetro o saccarimetro.

5. Modo di operare

5.1 *Preparazione del campione*

Macinare il campione in modo che passi tutto attraverso un setaccio a maglie rotonde di mm 0,5 di diametro.

5.2 *Determinazione del potere rotatorio totale (P o S) (v. osservazione 7.1)*

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 2,5 del campione macinato e introdurli in un pallone tarato da ml 100. Aggiungere ml 25 di acido cloridrico (3.2), agitare per ottenere una buona ripartizione della sostanza e aggiungere nuovamente ml 25 di acido cloridrico (3.2). Immergere il pallone in un bagno d'acqua bollente e agitare energicamente e regolarmente per i primi tre minuti allo scopo di evitare la formazione di grumi. La quantità d'acqua del bagno deve essere sufficiente per mantenerlo in ebollizione quando vi è immerso il pallone. Quest'ultimo non può essere tolto dal bagno durante l'agitazione. Dopo 15 minuti esatti, togliere il pallone dal bagno, aggiungervi ml 30 d'acqua fredda e raffreddare immediatamente sino a 20º C.

Aggiungere ml 5 di soluzione di Carrez I (3.3) e agitare per un minuto. Aggiungere quindi ml 5 di soluzione di Carrez II (3.4) e agitare nuovamente per un minuto. Portare a volume con acqua, mescolare e filtrare.

▼B

Se il filtrato non è perfettamente limpido (caso poco frequente) ripetere la determinazione usando una maggiore quantità di soluzione di Carrez I e II, per esempio ml 10.

Misurare quindi il potere rotatorio della soluzione, in tubo da mm 200, con un polarimetro od un saccarimetro.

5.3 *Determinazione del potere rotatorio (P′ o S′) delle sostanze solubili nell'etanolo al 40 %*

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 5 del campione, introdurli in un pallone tarato da ml 100 e aggiungere circa ml 80 di etanolo (3.5) (v. osservazione 7.2). Lasciare il pallone in attesa per un'ora a temperatura ambiente agitando energicamente sei volte in modo che la sostanza sia ben mescolata con l'etanolo. Portare quindi a volume con etanolo (3.5), mescolare e filtrare.

Con una pipetta, introdurre ml 50 del filtrato (= g 2,5 del campione) in un matraccio di Erlenmeyer da ml 250, aggiungere ml 2,1 di acido cloridrico (3.1) e agitare energicamente. Applicare un refrigerante a riflusso sull'Erlenmeyer e immergere quest'ultimo in un bagno d'acqua bollente. Dopo 15 minuti esatti, ritirare l'Erlenmeyer dal bagno, travasarne il contenuto in un pallone tarato da ml 100, lavando con un poco di acqua fredda, e raffreddare sino a 20º C.

Chiarificare quindi con soluzioni di Carrez I (3.3) e II (3.4), portare a volume con acqua, mescolare, filtrare e misurare il potere rotatorio come indicato in 5.2, secondo e terzo capoverso.

6. **Calcolo dei risultati**

Il contenuto in amido per cento di campione è calcolato come segue:

6.1 *Misurazioni effettuate con il polarimetro*

$$\text{percentuale di amido} = \frac{2000\ (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = potere rotatorio totale in gradi d'arco

P′ = potere rotatorio in gradi d'arco delle sostanze solubili nell'etanolo al 40 %

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = potere rotatorio specifico dell'amido puro

Per questo fattore sono accettati convenzionalmente i seguenti valori:

+ 185,9º: amido di riso

▼C1

+ 185,4º: amido di patata

▼B

+ 184,6º: amido di granoturco

+ 182,7º: amido di frumento

+ 181,5º: amido d'orzo

+ 181,3º: amido d'avena

+ 184,0º: altri tipi di amido, nonché miscele di amidi degli alimenti composti.

6.2 *Misurazioni effettuate con il saccarimetro*

$$\text{percentuale di amido} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \cdot \frac{(2\ N \cdot 0,665)\ (S - S')}{100} = \frac{26,6\ N\ (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = potere rotatorio totale in gradi saccarimetrici

S′ = potere rotatorio in gradi saccarimetrici delle sostanze solubili nell'etanolo al 40 %

N = peso in g di saccarosio in ml 100 di acqua che sotto lo spessore di mm 200 dà un potere rotatorio di 100º saccarimetrici:

g 16,29 per i saccarimetri francesi

g 26,00 per i saccarimetri tedeschi

g 20,00 per i saccarimetri misti

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = potere rotatorio specifico dell'amido puro (v. 6.1).

▼B

6.3 *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati delle due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve essere superiore a 0,4 in valore assoluto per i contenuti in amido inferiori al 40 per cento, 1 per cento in valore relativo per i contenuti in amido uguali o superiori al 40 per cento.

7. **Osservazioni**

7.1 Quando il campione contiene più del 6 per cento di carbonati, espressi come carbonato di calcio, i medesimi debbono essere eliminati mediante trattamento con la quantità esattamente appropriata di acido solforico, prima di determinare il potere rotatorio totale.

7.2 Nel caso di prodotti ad alto contenuto in lattosio, quali il siero di latte in polvere, il latte scremato in polvere, procedere come segue dopo aver aggiunto gli 80 ml di etanolo (3.5). Adattare sul pallone un refrigerante a riflusso, immergere il pallone per 30 minuti in un bagno d'acqua a 50º C. Lasciare poi raffreddare e continuare l'analisi come indicato in 5.3.

▼M3

2. DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE GREGGE

1. **Scopo e campo d'applicazione**

Il metodo permette di determinare il contenuto in proteine gregge dei mangimi a partire dal contenuto in azoto, dosato secondo Kjeldahl.

2. **Principio**

Il campione viene digerito in acido solforico in presenza di un catalizzatore. La soluzione acida viene alcalinizzata cjon una soluzione d'idrossido di sodio. L'ammoniaca liberatasi viene isolata per distillazione e viene raccolta in una quantità determinata di acido solforico, il cui eccesso è titolato con una soluzione standard d'idrossido di sodio.

3. **Reattivi**

3.1 Sulfato di potassio

3.2 Catalizzatore: ossido rameico CuO p.a., o solfato di rame (II) pentaidrato, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

3.3 Zinco in granelli

3.4 Acido solforico ρ_{20} = 1.84 g/ml

3.5 Acido solforico $c(\frac{1}{2}H_2SO_4)$ = 0,5 mol/l

3.6 Acido solforico $c(\frac{1}{2}H_2SO_4)$ = 0,1 mol/l

3.7 Indicatore al rosso di metile: sciogliere mg 300 di rosso di metile in ml 100 di etanolo, σ = 95-96 % (v/v)

3.8 Soluzione d'idrossido di sodio (è possibile usare quello di purezza tecnica), β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %)

3.9 Soluzione d'idrossido di sodio c = 0,25 mol/l

3.10 Soluzione d'idrossido di sodio c = 0,1 mol/l

3.11 Pietra pomice in granelli, lavata con acido cloridrico e calcinata

3.12 Acetanilide (p.m. = 114 ºC, N = 10,36 %)

3.13 Saccarosio (esente da azoto)

4. **Apparecchiatura**

Apparecchi di mineralizzazione, distillazione e titolazione secondo il metodo di Kjeldahl

5. **Metodo di operare**

5.1 *Mineralizzazione*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g del campione e introdurlo nel pallone dell'apparecchio di mineralizzazione. Aggiungere g 15 di solfato di potassio (3.1), una quantità appropriata di catalizzatore (3.2) [da g 0,3 a g 0,4 di ossido rameico, oppure da g 0,9 a g 1,2 di solfato di rame (II) pentaidrato], ml 25 di acido solforico (3.4) e qualche granello di pietra

▼M3

pomice (3.11). Mescolare. Riscaldare il pallone prima moderatamente, agitando di tanto in tanto, se necessario, fino a carbonizzazione della massa ed a scomparsa della schiuma; quindi più intensamente sino a ebollizione regolare del liquido. Il riscaldamento è adeguato se l'acido bollendo si condensa sulle pareti del pallone. Evitare che le pareti si surriscaldino e che particelle organiche vi aderiscano. Quando la soluzione diventa limpida e di colore verde pallido prolungare l'ebollizione ancora per due ore. Lasciar quindi raffreddare.

5.2 *Distillazione*

Aggiungere con precauzione un quantitativo d'acqua sufficiente a sciogliere completamente i solfati; lasciar raffreddare. Aggiungere quindi qualche granello di zinco (3.3).

Introdurre nel matraccio collettore dell'apparecchio di distillazione ml 25 esattamente misurati di acido solforico (3.5) oppure (3.6) a seconda del contenuto di azoto che si presume e qualche goccia di indicatore al rosso di metile (3.7).

Collocare il pallone al condensatore dell'apparecchio di distillazione ed immergere l'estremità di quest'ultimo per almeno cm 1 nel liquido del matraccio collettore (cfr. osservazione 8.3). Versare lentamente nel pallone ml 100 di soluzione di idrossido di sodio (3.8) senza perdita di ammoniaca (cfr. osservazione 8.1).

Scaldare il pallone fino a distillazione completa dell'ammoniaca.

5.3 *Titolazione*

Titolare nel matraccio collettore l'eccesso di acido solforico per mezzo di una soluzione di idrossido di sodio (3.9) o (3.10), secondo la concentrazione dell'acido solforico utilizzato, sino a raggiungimento del punto finale.

5.4 *Prova in bianco*

Per controllare se i reattivi sono esenti da azoto, effettuare una prova in bianco (mineralizzazione, distillazione e titolazione) usando g 1 di saccarosio (3.13) invece del campione.

6. **Calcolo dei risultati**

Calcolare il tenore di proteine gregge con la formula seguente:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

dove:

V_0 = volume di NaOH (3.9 o 3.10) usato nella prova in bianco

V_1 = volume (ml) di NaOH (3.9 o 3.10) usato nella titolazione del campione

c = concentrazione (mol/l) di idrossido di sodio (3.9 o 3.10)

m = massa (g) del campione

7. **Verifica del metodo**

7.1 *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve oltrepassare:

— 0,2 % in valore assoluto, per contenuti in proteine gregge inferiore al 20 %

— 1,0 % sul risultato più elevato, contenuti compresi tra 20 e 40 %

— 0,4 % in valore assoluto, per contenuti superiori al 40 %.

7.2 *Accuratezza*

Eseguire l'analisi (mineralizzazione, distillazione e titolazione) su 1,5 — 2,0 g di acetanilide (3.12) in presenza di g 1 di saccarosio (3.13): g 1 di acetanilide consuma 14,80 ml di acido solforico (3.5). Il recupero deve essere di almeno il 99 %.

▼M3

8. **Osservazioni**

8.1 Gli apparecchi possono essere del tipo manuale, semiautomatico od automatico. Se un apparecchio richiede un travasamento tra mineralizzazione e distillazione, in questo caso il travasamento deve essere effettuato senza perdite. Se il pallone dell'apparecchio di distillazione non è provvisto di un imbuto separatore, aggiungere la soluzione d'idrossido di sodio immediatamente prima di collegare il pallone al refrigerante, lasciando colare lentamente il liquido lungo le pareti.

8.2 Se il prodotto mineralizzato si solidifica, ricominciare la determinazione usando un quantitativo di acido solforico (3.4) superiore a quello specificato in precedenza.

8.3 Per i prodotti poveri di sostanze azotate, il volume di acido solforico (3.6) da introdurre nel matraccio può essere ridotto, se necessario, a ml 10 o 15 e portato a ml 25 con acqua.

▼B

3 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE GREGGE SOLUBILIZZABILI CON LA PEPSINA ED ACIDO CLORIDRICO

1. **Scopo e campo d'applicazione**

Il metodo permette di determinare la frazione delle proteine gregge solubilizzabili con la pepsina ed acido cloridrico in condizioni determinate. Esso è applicabile a tutti gli alimenti.

2. **Principio**

Il campione è sottoposto ad un trattamento con una soluzione cloridrica di pepsina per 48 ore a 40º C. La sospensione viene filtrata e il contenuto in azoto del filtrato viene determinato secondo il metodo descritto per la determinazione delle proteine gregge.

3. **Reattivi**

3.1 Acido cloridrico, d: 1,125

3.2 Acido cloridrico 0,075 N

3.3 Pepsina a 2,0 U/mg. Questa attività è definita e dev'essere controllata secondo il metodo che forma oggetto della parte 4 del presente allegato.

3.4 Soluzione allo 0,02 % circa (p/v) di pepsina nell'acido cloridrico (3.2), preparata di recente

3.5 Emulsione antischiuma (per esempio, silicone)

3.6 Tutti i reattivi indicati nel punto 3 del metodo per la determinazione delle proteine gregge.

4. **Apparecchiatura**

4.1 Bagno d'acqua o stufa di incubazione, regolata a 40º C ± 1º C

4.2 Apparecchi di mineralizzazione e di distillazione secondo Kjeldahl.

5. **Modo di operare**

5.1 *Preparazione della soluzione* (v. osservazione 7.2)

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 2 del campione, introdurli in un pallone tarato da ml 500 e aggiungere ml 450 di soluzione cloridrica di pepsina (3.4) preliminarmente portata a 40º C. Agitare in modo da evitare la formazione di agglomerati. Verificare che il pH della sospensione sia inferiore a 1,7. Porre il pallone nel bagno d'acqua o nella stufa di incubazione (4.1) e mantenervelo per 48 ore. Agitare dopo 8, 24 e 32 ore. Trascorse 48 ore, aggiungere ml 15 di acido cloridrico (3.1), raffreddare sino a 20º C, portare a volume con acqua e filtrare.

5.2 *Mineralizzazione*

Prelevare ml 250 del filtrato e introdurli nel pallone dell'apparecchio di distillazione (4.2). Aggiungere i reattivi necessari alla mineralizzazione come indicato nel metodo per la determinazione delle proteine gregge, punto 5.1, seconda frase.

Mescolare e riscaldare all'ebollizione. Se si forma della schiuma, aggiungere qualche goccia di emulsione antischiuma (3.5). Lasciare bollire

▼B

vivacemente sino ad evaporazione quasi completa dell'acqua. Eliminare le ultime tracce d'acqua con precauzione, riducendo l'intensità del riscaldamento. Quando la soluzione è limpida e incolore (verde chiaro in presenza di catalizzatore a base di rame) far bollire ancora per un'ora. Lasciare quindi raffreddare.

5.3 *Distillazione e titolazione*

Procedere come indicato nel metodo per la determinazione delle proteine gregge, punti 5.2 e 5.3.

5.4 *Prova in bianco*

Effettuare una prova in bianco applicando il modo di operare senza il campione da analizzare.

6. **Calcolo dei risultati**

Detrarre il volume di acido solforico consumato nella prova in bianco da quello consumato nella prova con la sostanza; ml 1 di acido solforico 0,1 N corrisponde a mg 1,4 d'azoto.

Moltiplicare la quantità di azoto per il fattore 6,25. Esprimere il risultato in per cento della sostanza.

Ripetibilità

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

— 0,4 in valore assoluto per i contenuti inferiori al 20 %;

— 2,0 % in valore relativo per i contenuti compresi tra 20 e 40 %;

— 0,8 in valore assoluto per i contenuti superiori al 40 %.

7. **Osservazioni**

7.1 I valori ottenuti con il presente metodo non hanno una relazione diretta con la digeribilità *in vivo*.

7.2 I prodotti il cui contenuto in materie grasse è superiore al 10 % debbono essere preliminarmente sgrassati mediante estrazione con etere di petrolio (ebollizione da 40 a 60º C).

4. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA PEPSINA

1. **Scopo e campo d'applicazione**

Il metodo permette di controllare l'attività della pepsina utilizzata per la determinazione delle proteine gregge solubilizzabili con la pepsina ed acido cloridrico.

2. **Principio**

L'emoglobina viene trattata, in determinate condizioni, con pepsina in ambiente cloridrico. La frazione non idrolizzata delle proteine viene precipitata con acido tricloroacetico. Il filtrato viene addizionato di idrossido di sodio e del reattivo secondo Folin-Ciocalteu. La densità ottica di questa soluzione viene misurata a mu 750 e la quantità di tirosina che le corrisponde viene letta su un diagramma di taratura.

Definizione: L'unità di pepsina si definisce come la quantità di questo enzima che libera in un minuto, nelle condizioni del metodo, una quantità di gruppi idrossiarile la cui colorazione con il reattivo secondo Folin-Ciocalteu ha una densità ottica corrispondente a quella di una µmole di tirosina, nelle stesse condizioni.

3. **Reattivi**

3.1 Acido cloridrico 0,2 N

3.2 Acido cloridrico 0,06 N

3.3 Acido cloridrico 0,025 N

3.4 Soluzione al 5 % (p/v) di acido tricloroacetico

3.5 Soluzione di idrossido di sodio 0,5 N

3.6 Reattivo secondo Folin-Ciocalteu. Introdurre g 100 di tungstato di sodio ($Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$), g 25 di molibdato di sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$) e ml

▼B

700 di acqua in un pallone a fondo rotondo da l 2 a smerigliatura normalizzata. Aggiungere ml 50 di acido fosforico (d: 1,71) e ml 100 di acido cloridrico concentrato (d: 1,19), collegare al pallone un refrigerante a riflusso, riscaldare fino ad ebollizione e far bollire adagio la soluzione per 10 ore. Lasciar raffreddare, staccare il refrigerante a riflusso, aggiungere g 175 di solfato di litio ($Li_2SO_4 \cdot 2\ H_2O$), ml 50 d'acqua e ml 1 di bromo. Far bollire per 15 minuti per eliminare l'eccesso di bromo. Lasciar raffreddare, travasare la soluzione in un pallone tarato da 1 l, portare a volume con acqua, mescolare e filtrare. Non deve aversi una colorazione verdastra. Prima dell'impiego, diluire 1 volume del reattivo con 2 volumi d'acqua.

3.7 Soluzione di emoglobina: pesare una quantità di emoglobina, substrato proteico secondo Anson (circa g 2), corrispondente a mg 354 d'azoto [1] ed introdurla in un pallone da ml 200 a smerigliatura normalizzata. Aggiungere alcuni ml d'acido cloridrico (3.2), collegare il pallone alla pompa a vuoto e agitare fino a dissoluzione completa dell'emoglobina. Interrompere il vuoto e aggiungere, agitando nel contempo, acido cloridrico (3.2) per portare a ml 100. *Preparare la soluzione immediatamente prima dell'impiego*.

3.8 Soluzione tipo di tirosina: sciogliere mg 181,2 di tirosina in acido cloridrico (3.1) e portare a l 1 con lo stesso acido (soluzione madre). Prelevare ml 20,0 e diluire a ml 100 con acido cloridrico (3.1); ml 1 di questa soluzione contiene μmoli 0,2 di tirosina.

4. **Apparecchiatura**

4.1 Bagno d'acqua, regolato, mediante l'ultratermostato, a 25° C ± 0,1° C

4.2 Spettrofotometro

4.3 Cronometro, precisione: 1 secondo

4.4 pH-metro.

5. **Modo di operare**

5.1 *Preparazione della soluzione* (v. osservazione 7.1)

Sciogliere mg 150 di pepsina in ml 100 di acido cloridrico (3.2). Prelevare con la pipetta ml 2 di soluzione, introdurli in un pallone tarato da ml 50 e portare a volume con acido cloridrico (3.3). Il pH controllato con il pH-metro deve essere 1,6 ± 0,1. Immergere il pallone nel bagno d'acqua (4.1).

5.2 *Idrolisi*

Pipettare in una provetta ml 5,0 di soluzione di emoglobina (3.7), portare a 25° C nel bagno d'acqua (4.1), aggiungere ml 1,0 della soluzione di pepsina ottenuta in 5.1 e mescolare con una bacchetta di vetro, appiattita ad un'estremità, con circa 10 movimenti di va e vieni. Mantenere la provetta nel bagno d'acqua a 25° C per 10 minuti esatti, calcolati a partire dal momento dell'aggiunta della soluzione di pepsina (la durata e la temperatura devono essere esattamente rispettate). Aggiungere quindi ml 10,0 di soluzione di acido tricloroacetico (3.4), preliminarmente portata a 25° C, mescolare e filtrare su un filtro asciutto.

5.3 *Sviluppo della colorazione e misura della densità ottica*

Prelevare con la pipetta ml 5,0 del filtrato, introdurli in una beuta da ml 50, aggiungere ml 10,0 di soluzione d'idrossido di sodio (3.5) e, agitando costantemente, ml 3,0 del reattivo diluito di Folin-Ciocalteu (3.6). Dopo 5 a 10 minuti, misurare la densità ottica della soluzione con lo spettrofotometro a nm 750 in vaschette di cm 1 di spessore, rispetto all'acqua.

5.4 *Prova in bianco*

Per ogni determinazione, eseguire una prova in bianco come indicato qui di seguito.

Pipettare in una provetta ml 5,0 di soluzione di emoglobina (3.7), portare a 25° C nel bagno d'acqua (4.1), aggiungere ml 10,0 di soluzione di acido tricloroacetico (3.4) preliminarmente portata a 25° C, mescolare e

[1] Determinare il contenuto in azoto con un semi-microkjeldhal (contenuto teorico: 17,7 % di azoto).

▼B

aggiungere quindi ml 1,0 della soluzione di pepsina ottenuto in 5.1. Mescolare con una bacchetta di vetro e tenere la provetta per 10 minuti esatti nel bagno d'acqua (4.1) a 25º C. Mescolare e filtrare su un filtro asciutto. Proseguire il modo d'operare come indicato in 5.3.

5.5 *Diagramma di taratura*

Introdurre in beuta da ml 50 dei volumi di ml 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 di soluzione tipo di tirosina (3.8), corrispondenti rispettivamente a quantità di tirosina di µmoli 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0. Completare la serie con un testimone senza tirosina. Portare i volumi a ml 5,0 con acido cloridrico (3.1). Aggiungere ml 10,0 di soluzione di idrossido di sodio (3.5) e, agitando costantemente, ml 3,0 del reattivo diluito di Folin-Ciocalteu (3.6). Misurare la densità ottica come indicato in 5.3, ultima frase. Tracciare il diagramma di taratura riportando le densità ottiche rispetto alle quantità di tirosina.

6. **Calcolo del risultato**

Leggere sul diagramma di taratura la quantità di tirosina, in µmoli, corrispondente alla densità ottica della soluzione colorata, corretta della prova in bianco.

L'attività della pepsina, in µmoli di tirosina per mg e per minuto, a 25º C, è data dalla formula:

$$\text{Unità per mg } (U/mg) = \frac{0,32\ a}{p}$$

nella quale

a = quantità di tirosina, in µmoli, letta sul diagramma di taratura;

p = peso in mg della quantità di pepsina aggiunta in 5.2.

7. **Osservazioni**

7.1 La quantità di pepsina da disciogliere deve essere scelta in modo da ottenere, nella misura spettrofotometrica finale, una densità ottica di 0,35 ± 0,035.

7.2 Due unità ottenute con il presente metodo corrispondono a:

3,64 milliunità Anson/mg (µmoli di tirosina/mg. min. a 35,5º C)

oppure

36.400 unità commerciali/g (µmoli di tirosina/g in 10 min. a 35,5º C).

5. DETERMINAZIONE DEL GOSSIPOLO LIBERO E TOTALE

1. **Scopo e campo di applicazione**

Il metodo permette di determinare il gossipolo libero, il gossipolo totale e le sostanze chimicamente affini nei semi, nelle farine e nei panelli di cotone e negli alimenti composti che ne contengono.

Il limite inferiore di determinabilità del metodo è di 20 ppm.

2. **Principio**

Il gossipolo viene estratto, in presenza di 3-amino-1-propanolo, con una miscela di isopropanolo-esano nel caso della determinazione del gossipolo libero, e con la dimetilformamide nel caso della determinazione del gossipolo totale. Il gossipolo è trasformato mediante anilina in gossipolo-dianilina, la cui densità ottica è misurata a 440 nm.

3. **Reattivi**

3.1 Miscela isopropanolo-esano: mescolare 60 parti in volume d'isopropanolo p.a. con 40 parti in volume di esano normale.

3.2 Solvente A: porre in un pallone tarato da l 1, circa ml 500 della miscela isopropanolo-esano (3.1), ml 2 di 3-amino-1-propanolo, ml 8 d'acido acetico glaciale e ml 50 d'acqua. Portare a volume con miscela di isopropanolo-esano (3.1). Questo reattivo è stabile per una settimana.

3.3 Solvente B: pipettare in un pallone tarato da ml 100, ml 2 di 3-amino-1-propanolo e ml 10 d'acido acetico glaciale. Raffreddare alla temperatura ambiente e portare a volume con N,N-dimetilformamide. Questo reattivo è stabile per una settimana.

▼B

3.4 Anilina p.a.: *se la densità ottica del saggio in bianco supera il valore 0,022* dev'essere distillata su polvere di zinco eliminando la prima e l'ultima frazione pari al 10 % del distillato. Posta in bottiglia chiusa di vetro bruno ed in frigorifero si conserva per parecchi mesi.

3.5 Soluzione tipo A di gossipolo: porre in un pallone tarato da ml 250, mg 27,9 d'acetato di gossipolo. Sciogliere e portare a volume impiegando il solvente A (3.2). Pipettare ml 50 di tale soluzione in un pallone tarato da ml 250 e portare a volume con il solvente A. La concentrazione in gossipolo di tale soluzione è di mg 0,02/ml. Lasciar riposare per un'ora alla temperatura ambiente prima dell'impiego.

3.6 Soluzione tipo B di gossipolo: porre in un pallone tarato da ml 50, mg 27,9 d'acetato di gossipolo. Sciogliere e portare a volume impiegando il solvente B (3.3). La concentrazione in gossipolo di tale soluzione è di 0,5 mg/ml. Le soluzioni tipo A e B di gossipolo restano stabili per 24 ore se sono conservate al buio.

4. **Apparecchiatura**

4.1 Mescolatore rotativo a capovolgimento: circa 25 capovolgimenti al minuto.

4.2 Spettofotometro.

5. **Modo di operare**

5.1 *Quantità di sostanza da sottoporre all'analisi*

La quantità di sostanza da sottoporre all'analisi è in rapporto al presunto contenuto in gossipolo del campione. È preferibile operare su una piccola quantità di sostanza e su una parte aliquota del filtrato relativamente importante, in modo da ottenere una quantità di gossipolo sufficiente per effettuare una misura spettofotometrica precisa. *Per la determinazione del gossipolo libero* nei semi, nelle farine e nei panelli di cotone, la quantità di sostanza da sottoporre all'analisi non deve sorpassare g 1; per gli alimenti composti potrà raggiungere g 5. Una parte aliquota di ml 10 di filtrato è sufficiente nella maggioranza dei casi; essa dovrà contenere da µg 50 a 100 di gossipolo. *Per la determinazione del gossipolo totale*, la quantità di sostanza da sottoporre ad analisi potrà variare da g 0,5 a 5 affinché una parte aliquota di ml 2 di filtrato contenga da µg 40 a 200 di gossipolo.

L'analisi deve essere effettuata ad una temperatura ambiente vicina a 20º C.

5.2 *Determinazione del gossipolo libero*

Porre la quantità di sostanza da sottoporre all'analisi in un pallone da ml 250 a collo smerigliato il cui fondo è ricoperto di polvere di vetro. Aggiungere, con una pipetta, ml 50 del solvente A (3.2), tappare il pallone e porlo per un'ora nel mescolatore rotativo a capovolgimento. Filtrare su un filtro asciutto e raccogliere il filtrato in un palloncino a collo smerigliato. Nel corso della filtrazione ricoprire l'imbuto con un vetro da orologio. Introdurre con una pipetta, rispettivamente in due palloni tarati da ml 25 (A e B), parti aliquote identiche di filtrato contenenti da µg 50 a 100 di gossipolo. Completare eventualmente a ml 10 con il solvente A (3.2). Completare quindi a volume il contenuto del pallone A con la miscela isopropanolo-esano (3.1). Questa soluzione sarà utilizzata come soluzione di riferimento per la misura della soluzione del campione.

Pipettare ml 10 del solvente A (3.2) rispettivamente in due altri palloni tarati da ml 25 (C e D). Portare a volume il contenuto del pallone (C) con la miscela isopropanolo-esano (3.1). Questa soluzione sarà utilizzata come soluzione di riferimento per la misura della soluzione del saggio in bianco.

Aggiungere ml 2 d'anilina (3.4) rispettivamente nei palloni (D) e (B). Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente per far sviluppare la colorazione. Raffreddare alla temperatura ambiente, portare a volume con miscela isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora.

Determinare allo spettrofotometro a nm 440, in vaschette di vetro da cm 1, la densità ottica della soluzione del saggio in bianco (D) di confronto con la soluzione di riferimento (C) e la densità ottica della soluzione del campione (B) di confronto con la soluzione di riferimento (A).

▼B

Sottrarre la densità ottica della soluzione del saggio in bianco da quella della soluzione del campione (= densità ottica corretta). Calcolare a partire da questo valore il contenuto in gossipolo libero come indicato al punto 6.

5.3 *Determinazione del gossipolo totale*

Introdurre la quantità di sostanza da sottoporre all'analisi, contenente da mg 1 a 5 di gossipolo, in un pallone tarato da ml 50 ed aggiungere ml 10 di solvente B (3.3). Preparare simultaneamente un saggio in bianco, introducendo ml 10 di solvente B (3.3) in un altro pallone tarato da ml 50. Riscaldare i due palloni per 30 minuti su un bagno d'acqua bollente. Raffreddare alla temperatura ambiente e portare a volume il contenuto di ciascun pallone con la miscela isopropanolo-esano (3.1). Mescolare e lasciar depositare per 10 a 15 minuti, quindi filtrare e raccogliere i filtrati in palloni a tappo smerigliato.

Pipettare ml 2 del filtrato del campione rispettivamente in due palloni tarati da ml 25 e ml 2 del filtrato del saggio in bianco rispettivamente in due altri palloni da ml 25. Prendere un pallone di ciascuna serie e completare i rispettivi contenuti a ml 25 con la miscela isopropanolo-esano (3.1). Queste soluzioni saranno utilizzate come soluzione di riferimento.

Aggiungere ml 2 d'anilina (3.4) rispettivamente negli altri due palloni. Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente per far sviluppare la colorazione. Raffreddare alla temperatura ambiente, completare il volume a ml 25 con la miscela isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciare riposare per un'ora.

Determinare la densità ottica come indicato in 5.2 per il gossipolo libero. Calcolare a partire da tale valore il contenuto in gossipolo totale come indicato al punto 6.

6. **Calcolo dei risultati**

Il calcolo dei risultati può essere fatto sia in base alla densità ottica specifica (6.1), sia riferendosi ad una curva di taratura (6.2).

6.1 *In base alla densità ottica specifica*

Nelle condizioni descritte le densità ottiche specifiche sono le seguenti:

gossipolo libero: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 625$

gossipolo totale: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 600$

Il contenuto in gossipolo libero o totale del campione è dato dalla formula seguente:

$$\text{gossipolo percento} = \frac{E \cdot 1250}{E^{1\,\%}_{1\,cm} \cdot p \cdot a}$$

nella quale:

E = densità ottica corretta, determinata come indicato in 5.2,

p = quantità in g di sostanza analizzata,

a = parte aliquota del filtrato espressa in ml.

6.2 *In base ad un diagramma di taratura*

6.2.1 *Gossipolo libero*

Predisporre 2 serie di 5 palloni tarati da ml 25. In ogni serie pipettare rispettivamente ml 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 della soluzione tipo A di gossipolo (3.5). Completare i volumi a ml 10 con il solvente A (3.2). Completare ogni serie con un testimone costituito da un pallone tarato da ml 25 contenente soltanto ml 10 del solvente A (3.2). Portare a ml 25 il volume dei palloni della prima serie (compreso il testimone) con la miscela isopropanolo-esano (3.1) (serie di riferimento).

Aggiungere ml 2 d'anilina (3.4) in ciascuno dei palloni della seconda serie (compreso il testimone). Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente per far sviluppare la colorazione. Raffreddare alla temperatura ambiente, portare a volume con la miscela isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora (serie tipo).

▼B

Determinare la densità ottica di ogni soluzione della serie tipo di confronto con la soluzione corrispondente della serie di riferimento, nelle condizioni indicate in 5.2. Tracciare graficamente il diagramma di taratura riportando le densità ottiche in funzione delle quantità di gossipolo (in μg).

6.2.2 *Gossipolo totale*

Predisporre 6 palloni tarati da ml 50. Porre nel primo ml 10 del solvente B (3.3) e negli altri rispettivamente ml 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 della soluzione tipo B di gossipolo (3.6). Completare il contenuto di ogni pallone a ml 10 con il solvente B (3.3). Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente. Raffreddare alla temperatura ambiente, portare a volume con la miscela isopropanolo-esano (3.1) e mescolare.

Porre ml 2,0 di queste soluzioni rispettivamente in due serie di 6 palloni tarati da ml 25. Completare a ml 25 il contenuto dei palloni della prima serie con la miscela isopropanolo-esano (3.1) (serie di riferimento).

Aggiungere ml 2 d'anilina (3.4) in ciascuno dei palloni della seconda serie. Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente. Raffreddare alla temperatura ambiente, portare a volume con la miscela isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora (serie tipo).

Determinare la densità ottica di ciascuna soluzione della serie tipo di confronto con la soluzione corrispondente della serie di riferimento, nelle condizioni indicate al punto 5.2. Tracciare graficamente il diagramma di taratura riportando le densità ottiche in funzione delle quantità di gossipolo (in μg).

6.3 *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni in parallelo eseguite sullo stesso campione non deve oltrepassare:

— 15 % in valore relativo per i contenuti in gossipolo inferiori a 500 ppm;

— 75 ppm in valore assoluto per i contenuti compresi tra 500 e 750 ppm;

— 10 % in valore relativo per i contenuti superiori a 750 ppm.

▼B

ALLEGATO II

1. RIVELAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DEGLI ANTIBIOTICI DEL GRUPPO DELLE TETRACICLINE

1. Oggetto e campo di applicazione

Il metodo permette di svelare ed identificare gli antibiotici del gruppo delle tetracicline nei mangimi che ne contengano almeno ppm 0,1, nei concentrati e nelle premiscele.

2. Principio

Il campione viene estratto con una miscela di metanolo ed acido cloridrico. L'estratto è cromatografato su carta per via ascendente comparativamente a delle soluzioni di referenza. Gli antibiotici vengono rivelati ed identificati confrontando i loro Rf con quelli delle sostanze di referenza, sia per fluorescenza alla luce UV (forti concentrazioni in antibiotici), sia per bioautografia in agar inoculato con *B. cereus*.

3. Reattivi e terreno colturale

3.1 *Tampone pH 3,5*

Acido citrico monoidrato p.a.	g 10,256
Fosfato disodico $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	g 7,45
Acetone p.a.	ml 300
Acqua distillata fino a	ml 1000

3.2 *Tampone fosfato pH 5,5*

Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 130,86
Fosfato disodico $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	g 6,947
Acqua distillata fino a	ml 1000

3.3 Eluente I: Miscela nitrometano puro/cloroformio puro/*α*-dicloridrina: 20/10/1,5 in vol. Preparare al momento dell'uso.

3.4 Eluente II: Miscela nitrometano puro/cloroformio puro/*α*-picolina: 20/10/3 in vol. Preparare al momento dell'uso.

3.5 Miscela metanolo puro/acido cloridrico (d: 1,19): 98/2 in vol.

3.6 Acido cloridrico 0,1 N

3.7 Ammoniaca, d: 0,91

3.8 Sostanze standard: clorotetraciclina, ossitetraciclina, tetraciclina, la cui attività è espressa in cloridrato.

3.9 *Microorganismo: B. cereus ATCC n. 11.778*

Conservazione del ceppo, preparazione della sospensione di spore ed inoculazione del terreno colturale: seguire quanto prescritto ai punti 3.1 e 3.2 del metodo di dosaggio della clorotetraciclina, della ossitetraciclina e della tetraciclina per diffusione in agar, secondo quanto è descritto nella parte 2 del presente allegato.

3.10 *Terreno di coltura* ([1])

Glucosio	g 1
Peptone tripsico	g 10
Estratto di carne	g 1,5
Estratto di lievito	g 3
Agar	g 20

([1]) Si possono utilizzare tutti i terreni commerciali e di composizione analoga purché forniscano gli stessi risultati.

▼B

Acqua distillata fino a ml 1000

aggiustare il pH a 5,8 al momento dell'uso.

3.11 Soluzione allo 0,1 % (p/v) di cloruro di 2, 3, 5-trifeniltetrazolio e 5 % (p/v) di glucosio.

4. **Apparecchiatura**

4.1 Apparecchio per cromatografia ascendente su carta (altezza della carta: cm 25). Carta Schleicher e Schüll 2040 b oppure 2043 b, o equivalente

4.2 Centrifuga

4.3 Termostato, regolato a 30º C

4.4 Lampada UV per il rivelamento della fluorescenza

4.5 Piastre di vetro di cm 20 × 30 circa, che permettano il montaggio di una piastra piana per bioautografia.

5. **Soluzioni di referenza**

5.1 *Soluzioni madri*

Preparare a partire dalle sostanze standard (3.8) e con acido cloridrico (3.6), delle soluzioni le cui concentrazioni corrispondano rispettivamente a µg 500 di clorotetraciclina — HCl, di ossitetraciclina — HCl e di tetraciclina — HCl per ml.

5.2 *Soluzioni di referenza per il rivelamento in luce UV*

Diluire le soluzioni (5.1) con tampone fosfato (3.2) in modo da ottenere delle soluzioni le cui concentrazioni corrispondano a µg 100 di clorotetraciclina — HCl, ossitetraciclina — HCl e tetraciclina — HCl per ml.

5.3 *Soluzioni di referenza per il rivelamento per bioautografia*

Diluire le soluzioni (5.1) con tampone fosfato (3.2) in modo da ottenere delle soluzioni le cui concentrazioni corrispondano a µg 5 di clorotetraciclina — HCl, ossitetraciclina — HCl e tetraciclina — HCl per ml.

6. **Estrazione**

Quando il tenore presunto in antibiotico è inferiore a ppm 10, si può utilizzare sia il campione omogeneizzato, sia la frazione fine separata per setacciamento, dato che gli antibiotici si trovano di preferenza in questa frazione.

Sospendere il campione nella miscela (3.5) e centrifugare. Raccogliere il supernatante ed utilizzarlo tal quale o diluirlo, se necessario, con la miscela (3.5) in modo da ottenere delle concentrazioni in antibiotico di µg 100 (6.1) e µg 5 (6.2) circa per ml.

7. **Rivelamento ed identificazione**

7.1 *Cromatografia*

Immergere la carta nella soluzione tampone pH 3,5 (3.1). Eliminare l'eccesso di liquido comprimendo la carta tra due fogli di carta da filtro. Depositare quindi sulla carta deivolumi di ml 0,01 delle soluzioni di referenza (5.2 e 5.3) e dell'estratto (6.1 e 6.2). Per ottenere una buona separazione, il tenore approssimato di umidità della carta è determinante; nel caso, lasciare seccare leggermente.

Sviluppare per cromatografia ascendente. Usare l'eluente I (3.3) per il rivelamento per bioautografia; l'eluente II (3.4) per il rivelamento alla luce UV. Quando il solvente è arrivato da cm 15 a 20 di altezza (circa 90 minuti), interrompere la cromatografia ed asciugare la carta.

7.2 *Rivelamento alla luce UV*

Quando il tenore in antibiotico è superiore a 1 µg/cm², si notano delle macchie fluorescenti giallo-oro in seguito ad irradiazione sotto luce UV (4.4) dopo trattamento del cromatogramma con vapori di ammoniaca (3.7).

▼B

7.3 *Rivelamento per bioautografia*

Versare il terreno di coltura (3.10), precedentemente seminato con *B. cereus* (3.9), sulla piastra di vetro (4.5) e posare la carta sul terreno di coltura. Dopo 5 minuti di contatto, togliere la carta e posarla su un'altra zona di terreno colturale, dove sarà lasciata durante il periodo d'incubazione. Incubare quindi per una notte in termostato a 30º C. La presenza di un antibiotico del gruppo delle tetracicline si evidenzia per la presenza di una zona d'inibizione chiara nel terreno colturale torbido.

Per fissare i cromatogrammi, vaporizzare sulla carta, dopo incubazione, la soluzione (3.11).

7.4 *Identificazione*

I valori Rf relativi degli antibiotici del gruppo delle tetracicline vengono riportati qui sotto. Questi valori possono variare leggermente a seconda della qualità della carta e del suo tenore in umidità.

Clorotetraciclina (CTC)	0,60
Tetraciclina (TC)	0,40
Ossitetraciclina (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

I composti «epi» presentano un'attività antibiotica inferiore a quella dei composti normali.

2. DOSAGGIO DELLA CLOROTETRACICLINA, DELLA OSSITETRACICLINA E DELLA TETRACICLINA

A. PER DIFFUSIONE SU AGAR

1. **Oggetto e campo di applicazione**

Il metodo permette di dosare la clorotetraciclina (CTC), l'ossitetraciclina (OTC) e la tetraciclina (TC) nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di ppm 5. I tenori inferiori a ppm 5 possono essere valutati per interpolazione grafica.

2. **Principio**

Per le concentrazioni uguali od inferiori a ppm 50, il campione viene estratto con formamide diluita. Per concentrazioni superiori a ppm 50, viene estratto con una miscela acetone, acqua e acido cloridrico per il dosaggio della CTC e con una miscela di metanolo e di acido cloridrico per il dosaggio dell'OTC e della TC.

Gli estratti sono quindi diluiti e la loro attività antibiotica è determinata misurando la diffusione della CTC, dell'OTC e della TC su un agar nutritivo seminato con *B. cereus*. La diffusione è indicata dalla formazione di una zona d'inibizione in presenza del microorganismo. Il diametro di queste zone è direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione dell'antibiotico.

3. **Microorganismo: B. cereus ATCC n. 11.778**

3.1 *Conservazione del ceppo*

Seminare *B. cereus* in un tubo di terreno colturale (4.1), *privo di bleu di metilene ed acido borico*. Incubare per una notte a 30º C circa. Conservare il ceppo in frigorifero e trapiantarlo ogni 14 giorni.

3.2 *Preparazione della sospensione di spore*

Raccogliere la patina di una agar coltura (3.1) con ml 2 a 3 di soluzione fisiologica (4.5). Seminare con questa sospensione una bottiglia di Roux contenente ml 300 di terreno colturale (4.1), *senza bleu di metilene ed acido borico*, la cui concentrazione in agar è del 3 a 4 %. Incubare per 3 a 5 giorni da 28 a 30º C, raccogliere quindi le spore con ml 15 di etanolo (4.6) dopo aver controllato la sporificazione al microscopio, ed omogeneizzare. Questa sospensione si può conservare in frigorifero per oltre 5 mesi.

Mediante prove preliminari su piastra con il terreno per il dosaggio (4.1), stabilire la quantità d'inoculo che produce per le differenti concentrazioni di antibiotico usate, le zone di diffusione più estese, che siano ancora

▼B

nette. Questa quantità generalmente è di ml 0,2 a 0,3/1000 ml. La semina viene eseguita su terreno fuso e raffreddato da 50 a 60º C.

4. **Terreno colturale e reattivi**

4.1 *Terreno base per il dosaggio* ([1])

Glucosio	g 1
Peptone tripsico	g 10
Estratto di carne	g 1,5
Estratto di lievito	g 3
Agar, secondo la qualità	g 10 a 20
Tween 80	ml 1
Tampone fosfato pH 5,5 (4.2)	ml 10
Soluzione al 5 % (p/v) di acido borico	ml 15
Soluzione etanolica allo 0,5 % di bleu di metilene	ml 4
Acqua distillata fino a	ml 1000

Aggiustare il pH a 5,8 al momento dell'uso

4.2 *Tampone fosfato, pH 5,5*

Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 130,86
Fosfato disodico $Na_2HPO \cdot 2\ H_2O$ p.a.	g 6,947
Acqua distillata fino a	ml 1000

4.3 Tampone fosfato pH 5,5 diluito 1/10

4.4 *Tampone fosfato pH 8*

Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 1,407
Fosfato disodico $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	g 57,539
Acqua distillata fino a	ml 1000

4.5 Soluzione fisiologica sterile

4.6 Etanolo al 20 % (v/v)

4.7 Acido cloridrico 0,1 N

4.8 Formamide al 70 % (v/v): prepararla prima dell'uso ed aggiustare il pH a 4,5 con acido solforico 2 N circa

4.9 Miscela acetone puro/acqua/acido cloridrico (d: 1,19): 65/33/2 in vol.

4.10 Miscela metanolo puro/acido cloridrico (d: 1,19): 98/2 in vol.

4.11 Sostanze standard: CTC, OTC e TC la cui attività è espressa in cloridrato

5. **Soluzioni standard**

5.1 *Clorotetraciclina*

Preparare a partire dalla sostanza standard (4.11) con acido cloridrico (4.7) una soluzione madre la cui concentrazione corrisponda a µg 500 di clorotetraciclina — HCl per ml. Questa si conserva per una settimana in frigorifero.

A partire da questa soluzione, preparare una soluzione standard di lavoro S_8 la cui concentrazione corrisponda a µg 0,2 di clorotetraciclina—HCl per ml. La diluizione viene fatta con tampone fosfato pH 5,5 diluito 1/10 (4.3) addizionato dello 0,01 % di nero d'amido ([2]).

([1]) Si possono utilizzare tutti i terreni commerciali e di composizione analoga purché forniscano gli stessi risultati.

([2]) Il nero d'amido serve per caratterizzare le zone d'inibizione delle soluzioni standard (anelli bleu).

▼B

Preparare quindi, per diluizioni successive (1 + 1), usando lo stesso tampone (4.3), le seguenti concentrazioni:

S_4 0,1 µg/ml

S_2 0,05 µg/ml

S_1 0,0125 µg/ml

5.2 *Ossitetraciclina*

Operando come indicato in 5.1, preparare, a partire da una soluzione madre la cui concentrazione corrisponda a µg 400 di ossitetraciclina—HCl per ml, una soluzione di lavoro S_8 a µg 1,6 di ossitetraciclina—HCl per ml e le concentrazioni seguenti:

S_4 0,8 µg/ml

S_2 0,4 µg/ml

S_1 0,2 µg/ml

5.3 *Tetraciclina*

Operando come indicato in 5.1, preparare, a partire da una soluzione madre la cui concentrazione corrisponda a µg 500 di tetraciclina—HCl per ml, una soluzione di lavoro S_8 a µg 1,0 di tetraciclina—HCl per ml e le concentrazioni seguenti:

S_4 0,5 µg/ml

S_2 0,25 µg/ml

S_1 0,125 µg/ml

6. **Estrazione**

6.1 *Concentrazioni uguali od inferiori a ppm 50*

Estrarre con formamide (4.8) una quantità di campione, secondo le indicazioni date nella tabella sotto riportata. Agitare per 30 minuti su agitatore a scuotimento. Diluire immediatamente dopo, con tampone fosfato (4.3), secondo le indicazioni date nella tabella sotto riportata, per ottenere la concentrazione U_8. La concentrazione in formamide di questa soluzione non deve superare il 40 %. Centrifugare o lasciare decantare in modo da ottenere una soluzione limpida. Preparare quindi le concentrazioni U_4, U_2 e U_1 per diluizioni successive (1 + 1) con tampone fosfato (4.3).

Antibiotico	CTC		OTC		TC	
Tenore presunto in ppm	10	50	10	50	10	50
Quantità di campione g	10	10	24	9,6	20	10
ml di formamide (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml di tampone fosfato (4.3)	dil. 1: 5 (a)	dil. 1: 25 (b)	70	200	120	dil. 1: 5 (a)
Concentrazione U_9 in µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Prelevare ml 20 di estratto e portarli a ml 100 con il tampone in pallone tarato.
(b) Prelevare ml 4 di estratto e portarli a ml 100 con tampone in pallone tarato.

6.2 *Concentrazioni superiori a ppm 50*

6.2.1 *Clorotetraciclina*

Estrarre, secondo la concentrazione presunta in antibiotico o secondo la garanzia di fabbricazione, un quantitativo di g 2 a 10 di campione con 20 volte il suo volume di miscela (4.9). Agitare

▼B

per 30 minuti in agitatore a scuotimento. Verificare che il pH resti inferiore a 3 nel corso dell'estrazione; se necessario aggiustare il pH a 3 (per i composti minerali, con acido acetico al 10 %). Prelevare una parte di estratto ed aggiustare il pH a 5,5 con tampone fosfato a pH 8 (4.4) in presenza di verde di bromocresolo (viraggio dal giallo al bleu). Diluire con tampone fosfato pH 5,5 diluito 1/10 (4.3) per ottenere la concentrazione U_8 (v. 6.1). Preparare quindi le concentrazioni U_4, U_2 ed U_1 per diluizioni successive (1 + 1) con tampone fosfato (4.3).

6.2.2 *Ossitetraciclina e tetraciclina*

Procedere come indicato in 6.2.1 sostituendo la miscela (4.9) con la miscela (4.10).

7. **Modalità di dosaggio**

7.1 *Semina del terreno colturale*

Seminare il terreno base colturale (4.1), fuso e raffreddato da 50 a 60º C con la sospensione di spore (3.2).

7.2 *Preparazione delle piastre*

La diffusione su agar si effettua in delle piastre con le 4 concentrazioni della soluzione standard (S_8, S_4, S_2 e S_1) e le 4 concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2 e U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le 4 concentrazioni dello standard e dell'estratto.

A tale scopo, scegliere delle piastre di dimensioni tali che si possano praticare nell'agar almeno 8 cavità (pozzetti) di mm 10 a 13 di diametro. Calcolare la quantità di terreno base inoculato (7.1) da utilizzare per ottenere uno strato di agar uniforme di circa mm 2 di spessore. È preferibile utilizzare, come piastre, delle lastre di vetro piane munite di un anello di alluminio o di materiale plastico perfettamente levigate di mm 200 di diametro e di mm 20 di altezza.

Introdurre con pipetta nelle cavità delle quantità esattamente misurate della soluzione dell'antibiotico comprese tra ml 0,10 a 0,15, a seconda del diametro.

Per ciascun campione, fare almeno 4 repliche di diffusione per ciascuna concentrazione, in modo che ogni dosaggio comporti la valutazione di 32 zone d'inibizione.

7.3 *Incubazione*

Incubare le piastre per 18 ore circa da 28 a 30º C.

8. **Valutazione**

Misurare i diametri delle zone d'inibizione, preferibilmente, per proiezione. Riportare le misure su carta semi-logaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni nei confronti dei diametri degli aloni di inibizione. Tracciare le rette della soluzione standard e dell'estratto. In assenza d'interferenze, le due rette devono essere parallele. Il logaritmo dell'attività relativa viene calcolato utilizzando la formula seguente:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Attività reale = attività presunta × attività relativa.

9. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve sorpassare 10 % in valore relativo.

B. PER TURBIDIMETRIA

1. **Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di dosare la clorotetraciclina (CTC), la ossitetraciclina (OTC) e la tetraciclina (TC) a concentrazioni superiori a 1 g/kg, nella misura in cui nessuna altra sostanza interferisca dando luogo a degli estratti torbidi. Questo metodo è più rapido di quello per diffusione su agar.

▼B

2. **Principio**

Il campione è sottoposto ad estrazione con una miscela di acetone, acqua, acido cloridrico per il dosaggio della CTC e con una miscela di metanolo e acido cloridrico per il dosaggio della OTC e della TC.

Gli estratti sono quindi diluiti ed il loro effetto antibiotico è determinato misurando la trasmissione luminosa d'un terreno colturale seminato con *Staphylococcus aureus* ed addizionato dell'antibiotico. La trasmissione luminosa è in funzione della concentrazione dell'antibiotico.

3. **Microorganismo: Staphylococcus aureus K 141** ([1])

3.1 *Conservazione del ceppo*

Seminare *Staphylococcus aureus* in un tubo di terreno colturale (4.1) *addizionato di* 1,5 a 3 % di agar (secondo la qualità). Incubare per una notte a 37° C. Conservare il ceppo in frigorifero e trapiantarlo in agar ogni 4 settimane. Preparare contemporaneamente delle subcolture per l'uso di laboratorio.

3.2 *Preparazione dell'inoculo*

24 ore prima dell'utilizzazione, trapiantare una subcoltura in un tubo di agar ed incubarla per una notte a 37° C. Raccogliere la patina colturale con ml 2 circa di terreno base (4.1) e trasferire quindi sterilmente la sospensione in ml 100 dello stesso terreno base (4.1). Incubare a bagnomaria a 37° C, finché la crescita del germe entri in fase logaritmica (90 a 120 minuti).

4. **Terreno colturale e reattivi**

4.1 *Terreno base di dosaggio* ([2])

Peptone	g 5
Estratto di lievito	g 1,5
Estratto di carne	g 1,5
Cloruro di sodio	g 3,5
Glucosio	g 1,0
Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 1,32
Fosfato bipotassico K_2HPO_4 p.a.	g 3,68
Acqua distillata fino a	ml 1000

pH dopo sterilizzazione: 6,8 a 7,0

4.2 *Tampone fosfato pH 4,5*

Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 13,6
Acqua distillata fino a	ml 1000

4.3 Acido cloridrico 0,1 N

4.4 Miscela acetone puro/acqua/acido cloridrico (d: 1,19): 65/33/2 in vol.

4.5 Miscela metanolo puro/acido cloridrico (d: 1,19): 98/2 in vol.

4.6 Soluzione al 10 % circa (p/v) di formaldeide

4.7 Sostanze standard: CTC, OTC e TC, la cui attività è espressa in cloridrato.

5. **Soluzioni standard**

Preparare a partire dalle sostanze standard (4.7) e con acido cloridrico (4.3) una soluzione madre la cui concentrazione corrisponda a µg 400 a 500 di CTC — HCl, OTC — HCl o TC — HCl per ml. Questa soluzione si conserva per una settimana in frigorifero.

([1]) Questo ceppo, isolato presso la LUFA a Kiel, presenta uno sviluppo più rapido dello *Staph. aureus ATCC 6538 P.*

([2]) Si possono utilizzare tutti i terreni commerciali e di composizione analoga purché forniscano gli stessi risultati.

▼B

6. **Estrazione**

6.1 *Clorotetraciclina*

Introdurre in un pallone tarato da ml 200 o 250, g 1 a 2 di campione in esame. Aggiungere ml 100 circa di miscela (4.4) e agitare per 30 minuti in agitatore a scuotimento. Portare a volume con tampone fosfato pH 4,5 (4.2). Omogeneizzare e lasciare riposare.

6.2 *Ossitetraciclina e tetraciclina*

Introdurre in un pallone tarato da ml 200 o 250, g 1 a 2 di campione in esame. Aggiungere ml 100 circa di miscela (4.5) ed agitare per 30 minuti in agitatore a scuotimento. Portare a volume con tampone fosfato pH 4,5 (4.2). Omogeneizzare e lasciare sedimentare.

7. **Modalità di dosaggio**

7.1 Diluire appropriatamente con tampone pH 4,5 (4.2) la soluzione standard (5.) e l'estratto (6.) in modo da ottenere una serie di concentrazioni che permettano di stabilire, per ciascun dosaggio, una curva standard e l'interpolazione, su questa curva, di almeno due valori relativi all'estratto.

Le diluizioni devono essere scelte in funzione delle condizioni di crescita del ceppo, che pessono variare da un laboratorio ad un altro. Generalmente si procede come segue:

7.1.1 *Clorotetraciclina*

Diluire la soluzione standard (5.) con tampone fosfato (4.2) in modo da ottenere la soluzione standard di lavoro la cui concentrazione corrisponda a µg 0,2 di CTC—HCl per ml. Preparare quindi con tampone fosfato (4.2), come sotto indicato e nei tubi destinati al dosaggio, 6 diluizioni con una ripetizione di ciascuna diluizione.

ml di soluzione standard di lavoro	ml di tampone fosfato (4.2)	Conc. in CTC-HCl o TC-HCl (µg/ml/)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Diluire l'estratto (6.1) con tampone fosfato (4.2) in modo da ottenere una concentrazione presunta in CTC — HCl di µg 0,12 ml. Introdurre ml 1 di questa soluzione in 2 tubi e ml 0,75 (= µg 0,09) in altri 2 tubi. Completare il volume degli ultimi due tubi a ml 1 con tampone fosfato (4.2).

7.1.2 *Ossitetraciclina e tetraciclina*

Diluire la soluzione standard (5.) con tampone fosfato (4.2) in modo da avere una soluzione standard di lavoro la cui concentrazione corrisponda a µg 0,6 di OTC — HCl o di TC — HCl per ml. Preparare quindi con tampone fosfato (4.2) come sotto indicato e nei tubi destinati al dosaggio, 7 diluizioni con una ripetizione di ciascuna diluizione.

ml di soluzione standard di lavoro	ml di tampone fosfato (4.2)	Conc. in CTC-HCl o TC-HCl (µg/ml/)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

▼B

Diluire l'estratto (6.2) con tampone fosfato (4.2) per ottenere una concentrazione presunta in OTC — HCl o TC — HCl di µg 0,48/ml. Introdurre ml 1 di questa soluzione in 2 tubi e ml 0,5 (= µg 0,24) in altri due tubi. Completare il volume degli ultimi due tubi a ml 1 con tampone fosfato (4.2).

7.2 *Semina del terreno di coltura*

Seminare il terreno base di dosaggio (4.1) con l'inoculo (3.2) in modo da ottenere al fotometro a nm 590 una trasmissione luminosa dell'85 % in una vaschetta di cm 5 o del 92 % in una vaschetta di cm 2, l'apparecchio è regolato al 100 % di trasmissione con terreno base (4.1) non seminato.

7.3 *Preparazione dei tubi di saggio*

Introdurre in ciascun tubo (7.1.1 o 7.1.2) ml 9 di terreno di coltura seminato (7.2). Il riempimento dei tubi deve essere fatto rapidamente ma non necessariamente in condizioni di sterilità.

7.4 *Incubazione*

L'incubazione deve farsi obbligatoriamente a bagnomaria (mantenendo la temperatura costante per agitazione dell'acqua) a 37º C ± 0,1º C. I tempi d'incubazione devono essere scelti in modo da poter tracciare delle curve di trasmissione la cui pendenza sia appropriata per delle misure precise (generalmente 2 ore e 30 minuti a 3 ore). Bloccare quindi lo sviluppo mescolando rapidamente ml 1 di soluzione di formaldeide (4.6) in ciascun tubo.

7.5 *Valutazione dello sviluppo*

Misurare le trasmissioni al fotometro a nm 590, regolando l'apparecchio a 100 % di trasmissione con la soluzione standard più limpida (corrispondente alla concentrazione più elevata in antibiotico). In ragione di deboli differenze di torbidità presentate dai differenti tubi, è raccomandabile utilizzare delle vaschette di almeno cm 2 e, di preferenza, di cm 5.

8. **Calcolo dei risultati**

Tracciare graficamente la curva di riferimento su carta millimetrata ponendo la trasmissione fotometrica nei confronti della concentrazione dell'antibiotico. Interpolare sulla curva le trasmissioni relative all'estratto. Calcolare il tenore in antibiotico del campione.

9. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve sorpassare 10 % in valore relativo.

3. DOSAGGIO DELL'OLEANDOMICINA

— Per diffusione su agar —

1. **Oggetto e campo di applicazione**

Il metodo permette di dosare l'oleandomicina nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele, anche in presenza di tetraciclina. Il limite inferiore di dosaggio è di ppm 0,5.

2. **Principio**

Il campione viene estratto con una soluzione metanolica diluita di tri (idrossimetile) amminometano. Dopo centrifugazione, l'estratto viene diluito e la sua attività antibiotica è determinata dalla misura della diffusione dell'oleandomicina su di un terreno colturale agarizzato insemenzato con *B. cereus*. La diffusione è indicata dalla formazione di zone di inibizione in presenza del microorganismo. Il diametro di queste zone è direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione dell'antibiotico.

3. **Microorganismo: B. cereus K 250 TR** ([1]) (resistente alle tetracicline)

3.1 *Conservazione del ceppo*

Seminare *B. cereus* in un tubo di terreno colturale (3.1) al quale sono stati aggiunti µg 100 di ossitetraciclina ogni ml 5 di terreno. Incubare

([1]) Ceppo isolato presso la LUFA a Kiel.

▼B

per una notte a 30º C circa. Conservare il ceppo in frigorifero e trapiantarlo ogni 4 settimane.

3.2 *Preparazione della sospensione di spore*

Raccogliere la patina di una agar coltura (3.1) con ml 3 circa di soluzione fisiologica (4.3). Seminare con questa sospensione una bottiglia di Roux contenente ml 300 di terreno colturale (4.1), ma *la cui concentrazione in agar è del 3 a 4 %*. Incubare per 3 a 5 giorni da 28 a 30º C, raccogliere quindi le spore con ml 15 di etanolo (4.4), dopo aver controllato la sporificazione al microscopio, ed omogeneizzare. Questa sospensione si può conservare in frigorifero per oltre 5 mesi.

Mediante prove preliminari su piastra con il terreno per il dosaggio (4.2), determinare la quantità di inoculo che consente di ottenere per le diverse concentrazioni di oleandomicina utilizzate, le zone di inibizione più estese, che siano ancora nette. Questa quantità è generalmente di ml 0,1 a 0,2/ml 1000. La semina viene eseguita su terreno fuso e raffreddato a 60º C.

4. **Terreni colturali e reagenti**

4.1 *Terreno di trapianto del ceppo* [1]

Glucosio	g 1
Peptone tripsico	g 10
Estratto di carne	g 1,5
Estratto di lievito	g 3
Agar, secondo la qualità	g 10 a 20
Acqua distillata fino a	ml 1000

Aggiustare il pH a 6,5 al momento dell'uso

4.2 *Terreno base per il dosaggio* [1]

Terreno (4.1) portato a pH 8,8

4.3 Soluzione fisiologica sterile

4.4 Etanolo al 20 % (v/v)

4.5 Metanolo, puro

4.6 Soluzione allo 0,5 % (p/v) di tri (idrossimetile) amminometano p.a.

4.7 *Soluzione di estrazione*

Metanolo, puro	ml 50
Acqua distillata	ml 50
Tri (idrossimetile) amminometano p.a.	g 0,5

4.8 Sostanza standard: oleandomicina di attività nota

5. **Soluzioni standard**

Sciogliere la sostanza standard (4.8) in ml 5 di metanolo (4 5) e diluire con la soluzione (4.6) per ottenere una concentrazione di oleandomicina di µg 100/ml.

A partire da questa soluzione madre, preparare diluendo con la soluzione (4.6) una soluzione standard di lavoro S_8 contenente µg 0,1 di oleandomicina per ml. Preparare quindi per diluizioni successive (1 + 1) mediante la soluzione (4.6), le seguenti concentrazioni:

S_4	0,05 µg/ml
S_2	0,025 µg/ml
S_1	0,0125 µg/ml

[1] Si possono utilizzare tutti i terreni commerciali e di composizione analoga purché forniscano gli stessi risultati.

▼B

6. **Estrazione**

Prelevare, secondo il contenuto presunto di oleandomicina, un quantitativo di campione di g 2 a 10; aggiungere ml 100 della soluzione (4.7) e agitare per 30 minuti in agitatore a scuotimento.

Centrifugare; diluire una parte aliquota dell'estratto con la soluzione (4.6) per ottenere una concentrazione presunta di oleandomicina di µg 0,1/ml. (=U_8) .Preparare qnuidi le concentrazioni U_4, U_2 e U_1 per diluizioni successive (1 + 1), mediante la soluzione (4.6).

7. **Modalità di dosaggio**

7.1 *Semina del terreno di coltura*

Seminare il terreno base per la determinazione (4.2), fuso e raffreddato a 60º C, con la sospensione di spore (3.2).

7.2 *Preparazione delle piastre*

La diffusione su agar si effettua su delle piastre con le 4 concentrazioni dello standard (S_8, S_4, S_2, S_1) e le 4 concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le 4 concentrazioni dello standard e dell'estratto.

A tale scopo, scegliere delle piastre di dimensioni tali che si possano praticare nell'agar almeno 8 cavità (pozzetti) da mm 10 a 13 di diametro. Calcolare la quantità di terreno colturale seminato (7.1) da utilizzare per ottenere uno strato di agar uniforme di circa mm 2 di spessore. È preferibile utilizzare come piastre delle lastre di vetro piano munite di un anello di alluminio o di materiale plastico perfettamente piano di mm 200 di diametro e mm 20 di altezza.

Introdurre con pipetta nelle cavità delle quantità esattamente misurate della soluzione di antibiotico comprese tra ml 0,10 e 0,15, a seconda del diametro. Per ogni campione fare almeno 4 repliche di diffusione con ciascuna concentrazione, in modo che ogni determinazione comporti la valutazione di 32 zone di inibizione.

7.3 *Incubazione*

Incubare le piastre per 18 ore circa da 28 a 30º C.

8. **Valutazione**

Misurare i diametri delle zone di inibizione preferibilmente per proiezione. Trascrivere le misure su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni nei confronti delle zone di inibizione. Tracciare le rette della soluzione standard e dell'estratto. In assenza di interferenza, le due rette debbono essere parallele.

Il logaritmo dell'attività relativa viene calcolato utilizzando la formula seguente:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Attività reale = attività presunta × attività relativa.

9. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve sorpassare 10 % in valore relativo.

4. DOSAGGIO DELLA TILOSINA

— per diffusione su agar —

1. **Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di dosare la tilosina nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele Il limite inferiore di dosaggio è di ppm 2.

2. **Principio**

Il campione viene estratto con una soluzione tampone fosfato a pH 8, preventivamente portato a 80º C, e sottoposto quindi all'estrazione con il metanolo. Dopo centrifugazione, l'estratto viene diluito e la sua attività antibiotica è

▼B

determinata dalla misura della diffusione della tilosina su di un terreno colturale agarizzato insemenzato con *Sarcina lutea*. La diffusione è indicata dalla formazione di zone di inibizione in presenza del microorganismo. Il diametro di queste zone è direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione dell'antibiotico.

3. **Microorganismo: Sarcina lutea ATCC n. 9341**

3.1 *Conservazione del ceppo*

Seminare *Sarcina lutea* in un tubo di terreno colturale (4.1) portato a pH 7,0. Incubare per una notte a 35º C circa. Conservare il ceppo in frigorifero e trapiantarlo ogni mese.

3.2 *Preparazione della sospensione di germi*

Raccogliere la patina di agar-coltura (3.1), preparata di fresco, con ml 2 a 3 di soluzione fisiologica (4.4). Seminare con questa sospensione una bottiglia di Roux contenente ml 250 di terreno colturale (4.1) portato a pH 7,0. Incubare per 24 ore a 35º C, raccogliere i germi con ml 25 di soluzione fisiologica (4.4). Omogeneizzare e diluire questa sospensione per ottenere una trasmissione luminosa del 75 % circa a nm 650.

Conservata in frigorifero, questa sospensione è utilizzabile una settimana.

Mediante prove preliminari su piastra con il terreno base per la determinazione (4.1), determinare la quantità di inoculo che consente di ottenere per le diverse concentrazioni di tilosina utilizzate, le zone di inibizione più estese, che siano ancora nette. La semina viene eseguita su terreno fuso e raffreddato da 48 a 50º C.

4. **Terreni colturali e reagenti**

4.1 *Terreno base per il dosaggio* ([1])

Glucosio	g 1
Peptone tripsico	g 10
Estratto di carne	g 1,5
Estratto di lievito	g 3
Agar, secondo la qualità	g 10 a 20
Acqua distillata fino a	ml 1000

Aggiustare al momento dell'uso il pH 7,0 per la conservazione del ceppo e la preparazione della sospensione dei germi ed a pH 8,0 per il dosaggio.

4.2 *Tampone fosfato, pH 8*

Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 0,523
Fosfato bipotassico K_2HPO_4 p.a.	g 16,730
Acqua distillata fino a	ml 1000

4.3 *Tampone fosfato, pH 7*

Fosfato monopotassico KH_2PO_4 p.a.	g 5,5
Fosfato bipotassico K_2HPO_4 p.a.	g 13,6
Acqua distillata fino a	ml 1000

4.4 Soluzione fisiologica sterile

4.5 Metanolo, puro

4.6 Metanolo a 40 % (v/v)

4.7 Miscela tampone fosfato (4.2) / metanolo, puro: 60/40 in vol.

([1]) Si possono utilizzare tutti i terreni commerciali e di composizione analoga purché forniscano gli stessi risultati.

▼B

4.8 Sostanza standard: tilosina di attività nota.

5. **Soluzione standard**

Essiccare la sostanza standard (4.8) per 3 ore a 60º C in una stufa sotto vuoto (mm 5 di mercurio). Pesare mg 10 a 50 in un pallone tarato, scioglierli in ml 5 di metanolo (4.5) e diluire la soluzione con il tampone fosfato, pH 7 (4.3) per ottenere una concentrazione di tilosina base di µg 1000/ml.

A partire da questa soluzione madre, preparare diluendo con la miscela (4.7) una soluzione standard di lavoro S_8 contenente µg 2 di tilosina base per ml.

Preparare quindi per diluizioni successive (1 + 1), mediante la miscela (4.7), le seguenti concentrazioni:

S_4	1 µg/ml
S_2	0,5 µg/ml
S_1	0,25 µg/ml

6. **Estrazione**

Preparare un quantitativo di g 10 per i concentrati e di g 20 per le premiscele e i mangimi. Aggiungere ml 60 di tampone fosfato, pH 8 (4.2), preventivamente portato a 80º C, e omogeneizzare per due minuti (frullatore per uso domestico. Ultra-turrax, ecc.).

Lasciare quindi riposare per 10 minuti, aggiungere ml 40 di metanolo (4.5) e omogeneizzare per 5 minuti. Centrifugare, prelevare una certa aliquota dell'estratto e diluire con la miscela (4.7) per ottenere una concentrazione presunta di tilosina di µg 2/ml (= U_8). Preparare quindi le concentrazioni U_4, U_2 e U_1 per diluizioni successive (1 + 1) mediante la miscela (4.7). Per concentrazioni inferiori a ppm 10, evaporare l'estratto a secco in un evaporatore a rotazione a 35º C e riprendere il residuo con del metanolo al 40 % (4.6).

7. **Modalità di dosaggio**

7.1 *Semina del terreno di coltura*

Seminare il terreno base per il dosaggio (4.1) fuso e raffreddato da 48 a 50º C, e portato a pH 8,0 con la sospensione di germi (3.2).

7.2 *Preparazione delle piastre*

La diffusione su agar si effettua su delle piastre con le 4 concentrazioni dello standard (S_8, S_4, S_2, S_1) e le 4 concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le 4 concentrazioni dello standard e dell'estratto.

A tale scopo, scegliere delle piastre di dimensioni tali che si possano praticare nell'agar almeno 8 cavità (pozzetti) da mm 10 a 13 di diametro. Calcolare la quantità di terreno colturale seminato (7.1) da utilizzare per ottenere uno strato di agar uniforme di circa mm 2 di spessore. È preferibile utilizzare come piastre delle lastre di vetro piano munite di un anello di alluminio o di materiale plastico perfettamente piano di mm 200 di diametro e di mm 20 di altezza.

Introdurre con pipetta nelle cavità delle quantità esattamente misurate della soluzione di antibiotico comprese tra ml 0,10 e 0,15, a seconda del diametro.

Per ogni campione fare almeno 4 repliche di diffusione con ciascuna concentrazione, in modo che ogni determinazione comporti la valutazione di 32 zone di inibizione.

7.3 *Incubazione*

Incubare le piastre per una notte da 35 a 37º C.

8. **Valutazione**

Misurare il diametro delle zone di inibizione possibilmente per proiezione. Trascrivere le misure su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni nei confronti delle zone di inibizione. Tracciare le rette della soluzione standard e dell'estratto. In assenza di interferenza, le due rette devono essere parallele.

▼B

Il logaritmo dell'attività relativa viene calcolato utilizzando la formula seguente:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Attività reale = attività presunta × attività relativa.

9. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve sorpassare 10 % in valore relativo.

▼M2

5. DOSAGGIO DELLA VIRGINIAMICINA

— per diffusione in agar —

1. **Oggetto e campo di applicazione**

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

2. **Principio**

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

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

3.1. *Conservazione del ceppo*

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

3.2. *Preparazione della sospensione batterica* ([a])

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

4. **Terreni colturali e reattivi**

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

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

([1]) 1 mg di virginiamicina equivale a 1 000 unità «UK».
([a]) Possono essere impiegati altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano sospensioni di batteri analoghe.
([b]) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio che dia gli stessi risultati.

▼**M2**

4.2. *Tampone al fosfato, pH 6*

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

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

4.4. Metanolo.

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

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

4.7. Sostanza di riferimento: virginiamicina ad attività nota.

5. **Soluzioni di riferimento**

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

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

S_8	1	µg/ml
S_4	0,5	µg/ml
S_2	0,25	µg/ml
S_1	0,125	µg/ml

6. **Preparazione dell'estratto e delle soluzioni**

6.1. *Estrazione*

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

Pesare una quantità di 50,0 g di campione. Aggiungere 200 ml della soluzione (4.6), agitare per 30 minuti, poi lasciar depositare o centrifugare. Prelevare 20 ml del supernatante ed evaporare a 5 ml in evaporatore rotante, a temperatura non superiore a 40 ºC. Diluire il residuo con la miscela (4.5), fino ad ottenere una concentrazione presunta in virginiamicina pari a 1 µg/ml (= U_8).

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

Pesare una quantità di campione non superiore a 10,0 g e contenente da 1 a 50 mg di virginiamicina. Aggiungere 100 ml della soluzione (4.6), agitare per 30 minuti, poi lasciar depositare o centrifugare. Diluire il surnatante con la miscela (4.5) fino ad ottenere una concentrazione in virginiamicina pari a 1 µg/ml (= U_8).

6.2. *Soluzioni dell'estratto*

A partire dalla soluzione U_8, preparare per diluizioni successive (1: 1) con la miscela (4.5) le soluzioni U_4 (concentrazione presunta: 0,5 µg/ml), U_2 (concentrazione presunta: 0,25 µg/ml) ed U_1 (concentrazione presunta: 0,125 µg/ml).

7. **Modalità di dosaggio**

7.1. *Inoculazione del terreno di coltura*

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

7.2. *Preparazione delle piastre*

La diffusione in agar si effettua su piastre con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente conte-

▼M2

nere le quattro concentrazioni della sostanza di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che si possano praticare nel terreno agarizzato almeno otto pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti tra loro meno di 30 mm. Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm.

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

7.3. *Incubazione*

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

8. **Valutazione**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Per 4 punti

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

▼**M2**

Per 3 punti

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

o

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

Attività dell'estratto del campione = attività dello standard corrispondente × A:

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

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

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

Esprimere il risultato in mg virginiamicina/kg alimento.

9. **Ripetibilità**

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

— 2 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti in virginiamicina inferiori a 10 mg/kg;

— 20 % del risultato più elevato per i contenuti da 10 a 25 mg/kg;

— 5 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti da 25 a 50 mg/kg;

— 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 mg/kg.