384L0004

Nr L 15/28 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* 18.1.84

KOMMISSIONENS DIREKTIV

av den 20 december 1983

om ändring av direktiven 71/393/EEG, 72/199/EEG och 78/633/EEG om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(84/4/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen[1], senast ändrat genom Anslutningsakten för Grekland, särskilt artikel 2 i denna, och

med beaktande av följande:

I kommissionens direktiv 71/393/EEG[2], 72/199/EEG[3] och 78/633/EEG[4] anges analysmetoderna för råoljor och råfetter, virginiamycin och zinkbacitracin. Dessa metoder behöver ersättas med metoder som bygger på ny vetenskaplig och teknisk kunskap.

De åtgärder som beslutas om i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Ständiga foderkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

I bilagan till direktiv 71/393/EEG skall del 4, "Bestämning av råoljor och råfetter", ersättas med bilaga 1 till detta direktiv.

Artikel 2

I bilaga 2 till direktiv 72/199/EEG skall del 5, "Bestämning av virginiamycin genom agardiffusion", ersättas med bilaga 2 till detta direktiv.

Artikel 3

I bilagan till direktiv 78/633/EEG skall del 1, "Bestämning av zinkbacitracin genom diffusion i agarsubstrat", ersättas med bilaga 3 till detta direktiv.

Artikel 4

Medlemsstaterna skall senast den 1 juni 1984 sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv och skall genast underrätta kommissionen om detta.

Artikel 5

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 20 december 1983.

På kommissionens vägnar

Poul DALSAGER

Ledamot av kommissionen

---

(1) EGT nr L 170, 3.8.1970, s. 2.
(2) EGT nr L 279, 20.12.1971, s. 7.
(3) EGT nr L 123, 29.5.1972, s. 6.
(4) EGT nr L 206, 29.7.1978, s. 43.

BILAGA 1

"4. BESTÄMNING AV RÅOLJOR OCH RÅFETTER

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan halten råoljor och råfetter bestämmas i foder. Metoden täcker inte den analys av oljehaltiga frön och frukter som definieras i rådets förordning 136/66/EEG av den 22 september 1966.

Beroende på fodrets art används en av följande två metoder:

1.1 *Metod A*

Tillämpas på oblandat foder av vegetabiliskt ursprung med undantag av sådant foder som enligt tillgänglig information innehåller oljor och fetter som inte kan extraheras fullständigt med petroleumeter utan föregående hydrolys. Exempel på detta är gluten, jäster, soja- och potatisproteiner. Metoden skall också tillämpas på foderblandningar med undantag av sådana som innehåller torrmjölk eller från vilka oljor och fetter inte kan extraheras fullständigt med petroleumeter utan föregående hydrolys.

1.2 *Metod B*

Tillämpas på oblandat foder av animaliskt ursprung samt på sådant foder som nämns i punkt 1.1 som undantag från tillämpningen av metod A.

2. **Princip**

2.1 *Metod A*

Provet extraheras med petroleumeter. Lösningsmedlet destilleras bort och återstoden torkas och vägs.

2.2 *Metod B*

Provet behandlas med saltsyra under uppvärmning. Blandningen kyls och filtreras. Återstoden sköljs och torkas och undergår därefter bestämning enligt metod A.

3. **Reagens**

3.1 Petroleumeter, kokpunkt mellan 40 och 60 °C. Bromtalet måste vara lägre än 1 och återstoden efter förångningen mindre än 2 mg/100 ml.

3.2 Vattenfritt natriumsulfat.

3.3 Saltsyra 3 M.

3.4 Filtrermedel, t.ex. kiselgur, Hyflo-supercel.

4. **Utrustning**

4.1 Extraktionsutrustning. Om denna är försedd med hävert (Soxhletutrustning) skall förångningstakten vara sådan att cirka tio kretslopp sker per timme. Om hävert saknas, skall förångningstakten vara cirka 10 ml per minut.

4.2 Extraktionshylsor som är fria från material som är lösliga i petroleumeter och som har en porositet som motsvarar kraven i punkt 4.1.

4.3 Torkugn, antingen en vakuumtorkugn inställd på 75 ± 3 °C eller en varmluftsugn inställd på 100 ± 3 °C.

5. **Utförande**

5.1 *Metod A* (se 8.1)

Väg upp 5 g av provet med en noggrannhet av 1 mg och placera det i en extraktionshylsa (4.2) och täck med en tuss fettfri bomull.

Placera hylsan i extraktionsutrustningen (4.1) och extrahera med petroleumeter (3.1) under sex timmar. Samla petroleumeterextraktet i en torr, vägd kolv med pimpstensskärvor(1).

Destillera bort lösningsmedlet. Torka återstoden efter förångningen genom att förvara kolven under en och en halv timme i torkugnen (4.3). Kyl i en exsickator och väg. Torka åter under 30 minuter för att kontrollera att oljornas och fetternas vikt förblir konstant (viktförlusten måste vara mindre än 1 mg mellan två på varandra följande vägningar).

(1) Om oljan eller fettet skall genomgå därpå följande kvalitetstester ersätts pimpstensskärvorna med glaspärlor.

5.2 *Metod B*

Väg upp 2,5 g av provet med en noggrannhet av 1 mg (se 8.2) och placera det i en 400 ml bägare eller en 300 ml konisk kolv. Tillsätt 100 ml saltsyra 3 M (3.3) och pimpstensskärvor. Täck bägaren med ett klockglas eller anslut en återloppskylare till den koniska kolven. Koka upp blandningen lätt över svag låga eller på kokplatta och behåll den där under en timme. Se till att produkten inte fastnar på behållarens innerväggar.

Kyl och tillsätt så mycket filtrermedel (3.4) att inte någon olja eller något fett förloras under filtreringen. Filtrera genom fuktat, fettfritt, dubbelt filtrerpapper. Skölj återstoden i kallt vatten tills ett neutralt filtrat erhålls. Kontrollera att filtratet inte innehåller olja eller fett. Skulle så vara fallet, betyder det att provet måste extraheras med petroleumeter enligt metod A före hydrolys.

Placera det dubbla filtrerpapperet som innehåller återstoden på ett klockglas och torka i ugnen vid 100 ± 3 °C under en och en halv timme.

Placera det dubbla filtrerpapperet och den torkade återstoden i en extraktionshylsa (4.2) och täck med en fettfri bomullstuss. Placera hylsan i en extraktor (4.1) och fortsätt enligt anvisningarna i 5.1 andra och tredje stycket.

6. **Resultatberäkning**

Återstodens vikt uttrycks i procent av provet.

7. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan två parallella bestämningar som utförs på samma prov av samma analytiker får inte överstiga:

0,2 % absolutvärde för råolje- och råfetthalter under 5 %,

4,0 % av det högsta resultatet för halter mellan 5 och 10 %,

0,4 % absolutvärde för halter över 10 %.

8. **Anmärkningar**

8.1 Om produkterna har hög olje- och fetthalt och är svåra att krossa eller om det inte går att avskilja ett homogent prov för analys, används följande metod:

Väg upp 20 g av provet med en noggrannhet av 1 mg och blanda med 10 g eller mer vattenfritt natriumsulfat (3.2). Extrahera med petroleumeter (3.1) enligt anvisningarna i 5.1. Tillsätt petroleumeter (3.1) till det erhållna extraktet till en sammanlagd volym av 500 ml och homogenisera. Ta 50 ml av lösningen och häll i en torr och vägd liten kolv som innehåller pimpstensskärvor(1). Destillera bort lösningsmedlet, torka och fortsätt enligt anvisningarna i 5.1 sista stycket.

Avlägsna lösningsmedlet från återstoden efter extraktionen som finns kvar i hylsan och krossa extraktet till 1 mm stora partiklar, placera det på nytt i extraktionshylsan (tillsätt inte natriumsulfat) och fortsätt enligt anvisningarna i 5.1 andra och tredje stycket.

Beräkna olje- och fetthalten i procent av provet med följande formel:

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

där

a = återstodens massa uttryckt i gram efter första extraktionen (den del av extraktet som används för analys),

b = återstodens massa uttryckt i gram efter andra extraktionen.

8.2 Om produkterna har låg olje- och fetthalt, kan analysprovet utökas till 5 g."

---

(1) Om oljan eller fettet skall genomgå därpå följande kvalitetstester ersätts pimpstensskärvorna med glaspärlor.

BILAGA 2

"5. BESTÄMNING AV VIRGINIAMYCIN

– genom agardiffusion –

1. Syfte och räckvidd

Denna metod är avsedd för bestämning av virginiamycin i foder och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 2 mg/kg (2 ppm)([1]).

2. Princip

Provet extraheras med en lösning av Tween 80 i metanol. Extraktet dekanteras eller centrifugeras och späds ut. Dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av virginiamycinets diffusion i ett agarmedium som inokulerats med *Micrococcus luteus*. Diffusionen kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen för den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

3. Mikroorganism: micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1 *Skötsel av den lagerhållna odlingen*

Inokulera provrör som innehåller skikt av odlingsmedium (4.1) med micrococcus luteus och låt inkubera under 24 timmar vid 30 °C. Förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C. Upprepa inokuleringen varannan vecka.

3.2 *Beredning av bakteriesuspensionen*([a])

Samla in tillväxten från ett nypreparerat agarskikt (3.1) med 2–3 ml koksaltlösning (4.3). Använd denna suspension till att inokulera 250 ml odlingsmedium (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera 18–20 timmar vid 30 °C. Samla in tillväxten i 25 ml koksaltlösning (4.3) och blanda.

Späd ut lösningen med koksaltlösning (4.3) i proportionen 1/10. Suspensionens ljustransmission måste vara cirka 75 % uppmätt vid 650 nm i en 1 cm cell mot koksaltlösning (4.3). Denna suspension kan förvaras en vecka vid cirka 4 °C.

4. Odlingsmedium och reagens

4.1 *Odlings- och analysmedium*([b])

Köttpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vatten	1 000 ml

pH 6,5 (efter sterilisering)

4.2 *Fosfatbuffert, pH 6*

Kaliumvätefosfat, K_2HPO_4	2,0 g
Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4	8,0 g
Vatten till	1 000 ml

4.3 Koksaltlösning 0,8 % (vikt/volym): lös 8 g natriumklorid i vatten och späd till 1 000 ml. Sterilisera.

4.4 Metanol.

4.5 Blandning fosfatbuffert (4.2)/metanol (4.4): 80/20 (volym/volym).

4.6 Lösning av Tween 80 i metanol 0,5 % (vikt/volym): lös upp 5 g Tween 80 i metanol (4.4) och späd med metanol till 1 000 ml.

4.7 Standardsubstans: virginiamycin vars verkan är känd.

([1]) 1 mg virginiamycin motsvarar 1 000 brittiska enheter.

([a]) Andra metoder kan användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande bakteriesuspensioner.

([b]) Varje kommersiellt odlingsmedium med liknande sammansättning som ger samma resultat kan användas.

5. **Standardlösningar**

Lös upp en noggrant vägd kvantitet av standardsubstansen (4.7) i metanol (4.4) och späd med metanol (4.4) så att en lösning som innehåller 1 000 µg virginiamycin per ml erhålls. Denna lösning är stabil i upp till fem dagar om den förvaras i en tillsluten kolv vid 4 °C.

Av denna utgångslösning bereds genom successiv utspädning med blandningen (4.5) följande lösningar:

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

6. **Beredning av extraktet och analyslösningarna**

6.1 *Extraktion*

6.1.1 Produkter med en virginiamycinhalt upp till 100 mg/kg

Väg upp 50 g av provet, tillsätt 200 ml av lösningen (4.6) och skaka om under 30 minuter. Låt fällningen sjunka till botten eller centrifugera, ta 20 ml av dekanteringslösningen (supernatanten) och indunsta till cirka 5 ml i en rotationsindunstare vid en temperatur av högst 40 °C. Späd ut återstoden med blandningen (4.5) så att en förväntad virginiamycinhalt av 1 µg/ml (= u_8) erhålls.

6.1.2 Produkter med en virginiamycinhalt över 100 mg/kg

Väg upp högst 10,0 g av provet med ett virginiamycininnehåll av 1–50 mg, tillsätt 100 ml av lösningen (4.6) och skaka om under 30 minuter. Låt fällningen sjunka till botten eller centrifugera och späd därefter ut dekanteringslösningen (supernatanten) med blandningen (4.5) så att en förväntad virginiamycinhalt av 1 µg/ml (= u_8) erhålls.

6.2 *Analyslösningar*

Av lösning u_8 bereds lösningarna u_4 (förväntad halt: 0,5 µg/ml), u_2 (förväntad halt: 0,25 µg/ml) och u_1 (förväntad halt: 0,125 µg/ml) genom successiv utspädning (1 + 1) med blandningen (4.5).

7. **Analysmetod**

7.1 *Inokulering av analysmediet*

Inokulera analysmediet (4.1) med bakteriesuspensionen (3.2) vid cirka 50 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med mediet (4.1) vilken mängd av bakteriesuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av virginiamycin.

7.2 *Färdigställande av plattorna*

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (s_8, s_4, s_2 och s_1) och av analyslösningen (u_8, u_4, u_2 och u_1). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och lägst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarmediet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av mediet (4.1), som inokulerats enligt 7.1, att ett cirka 2 mm tjockt lager bildas (60 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stelna, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter) i hålen. Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

7.3 *Inkubation*

Inkubera plattorna under 16–18 timmar vid 30 ± 2 °C.

8. **Utvärdering**

Mät hämningszonernas diameter med en noggrannhet av 0,1 mm. För in genomsnittsvärdena för varje koncentration på semilogaritmiskt rutat papper så att logaritmen för koncentrationen i förhållande till hämningszonernas diameter visas. Fastställ optimumlinjerna för såväl standardlösningen som extraktet, t.ex. enligt följande:

Bestäm optimumpunkten för lägsta nivå standardlösning (SL) med formeln:

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

Bestäm optimumpunkten för högsta nivå standardlösning (SH) med formeln:

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut s_1, s_2, s_4 och s_8 mot u_1, u_2, u_4 och u_8 i ovanstående formler.

För in de beräknade värdena för SL och SH på samma papper och förbind dem så att optimumlinjen för standardlösningen erhålls. För på motsvarande sätt in UL och UH och förbind dem så att optimumlinjen för extraktet erhålls.

Om ingen interferens förekommer skall linjerna vara parallella. För praktiska ändamål kan linjerna anses vara parallella om värdena (SH–SL) och (UH–UL) inte avviker med mer än 10 % från sina medelvärden.

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen u_1 och s_1 eller u_8 och s_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med alternativformlerna så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma parallellitetskriterium måste tillfredsställas.

Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen för den relativa aktiviteten (log A) med en av följande formler beroende på om tre eller fyra nivåer har använts för att påvisa parallellitet.

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Provextraktets aktivitet = motsvarande standardlösnings aktivitet × A

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

Om den relativa aktiviteten befinns ligga utanför intervallet 0,5–2,0 upprepas analysen med lämpliga justeringar av koncentrationerna av extraktet eller, om detta inte är möjligt, av standardlösningarna. Om den relativa aktiviteten inte kan bringas inom det föreskrivna intervallet måste varje erhållet resultat anses vara approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår måste bestämningen anses vara otillfredsställande.

Uttryck resultatet i milligram virginiamycin per kilo foder.

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov av samma analytiker får inte överstiga:

2 mg/kg, absolutvärde, för halter av virginiamycin upp till 10 mg/kg,

20 % i förhållande till det högsta värdet vid halter på 10–25 mg/kg,

5 mg/kg, absolutvärde, för halter av virginiamycin mellan 25 och 50 mg/kg och

10 % i förhållande till det högsta värdet vid halter över 50 mg/kg."

BILAGA 3

"1. BESTÄMNING AV ZINKBACITRACIN

– genom diffusion i agarsubstrat –

1. Syfte och räckvidd

Denna metod är avsedd för bestämning av zinkbacitracin i foder och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 5 mg/kg (5 ppm)(1).

2. Princip

Provet extraheras vid pH 2 med en blandning av metanol/vatten/saltsyra och en natriumsulfidlösning. Tillsatsen av natriumsulfid är avsedd att fälla ut alla lösliga kopparsalter som kan påverka analysen. Extraktet bringas till pH 6,5, koncentreras (om så är nödvändigt) och späds ut. Dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av zinkbacitracinets diffusion i ett agarmedium som inokulerats med *Micrococcus luteus (flavus)*. Diffusionen kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen för den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

3. Mikroorganism: micrococcus luteus (flavus) ATCC 10240

3.1 *Skötsel av den lagerhållna odlingen*

Inokulera provrör som innehåller skikt av odlingsmedium (4.1) med *Micrococcus luteus (flavus)* och låt inkubera under 24 timmar vid 30 °C. Förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C. Upprepa inokuleringen varannan vecka.

3.2 *Beredning av bakteriesuspensionen*(a)

Samla in tillväxten från ett nypreparerat agarskikt (3.1) med 2–3 ml koksaltlösning (4.3). Använd denna suspension till att inokulera 250 ml odlingsmedium (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera 18–20 timmar vid 30 °C. Samla in tillväxten i 25 ml koksaltlösning (4.3) och blanda.

Späd ut lösningen med koksaltlösning (4.3) i proportionen 1/10. Suspensionens ljustransmission måste vara cirka 75 % uppmätt vid 650 nm i en 1 cm-cell mot koksaltlösning (4.3). Denna suspension kan förvaras en vecka vid cirka 4 °C.

4. Odlingsmedium och reagens

4.1 *Odlingsmedium*(b)

Köttpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 6,5–6,6 (efter sterilisering)	

4.2 *Analysmedium*(b)

Trypton	10,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Tween 80	1 ml
Vatten	1 000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.3 Koksaltlösning 0,8 % (vikt/volym): lös 8 g natriumklorid i vatten och späd till 1 000 ml. Sterilisera.

4.4 Blandning av metanol/vatten/saltsyra (4.6) enligt följande:

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

---

(1) 1 mg foderzinkbacitracin motsvarar 42 internationella enheter (IE).
(a) Andra metoder kan användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande bakteriesuspensioner.
(b) Varje kommersiellt odlingsmedium med liknande sammansättning som ger samma resultat kan användas.

4.5 *Fosfatbuffert, pH 6,5*

Kaliumvätefosfat, K_2HPO_4	22,15 g
Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4	27,85 g
Vatten till	1 000 ml

4.6 Saltsyra (d: 1,18 till 1,19).

4.7 Saltsyra (0,1 M).

4.8 Natriumhydroxidlösning 1 M.

4.9 Natriumsulfidlösning cirka 0,5 M.

4.10 Bromkresolpurpurlösning 0,04% (vikt/volym): lös upp 0,1 g bromkresolpurpur i 18,5 ml natriumhydroxidlösning 0,01 M. Tillsätt vatten till 250 ml och blanda.

4.11 Standardsubstans: zinkbacitracin vars verkan är känd (i IE).

5. **Standardlösningar**

Väg upp en mängd standardzinkbacitracin (4.11) som motsvarar 1050 IE (enligt angiven aktivitet). Tillsätt 5 ml saltsyra 0,1 M (4.7) och låt stå i 15 minuter. Tillsätt 30 ml vatten, justera pH till 4,5 med fosfatbuffert (4.5) (cirka 4 ml), tillsätt vatten till 50 ml volym och blanda väl (1 ml = 21 IE).

Av denna lösning bereds genom successiv utspädning med fosfatbuffert (4.5) följande lösningar:

s_8	0,42	IE/ml
s_4	0,21	IE/ml
s_2	0,105	IE/ml
s_1	0,0525	IE/ml

6. **Beredning av extraktet och analyslösningarna**

6.1 *Extraktion*

6.1.1 Premixer och mineralfoder

Väg upp 2,0–5,0 g av provet, tillsätt 29,0 ml av blandningen (4.4) och 1,0 ml natriumsulfidlösning (4.9) och skaka om hastigt. Kontrollera att pH är cirka 2. Skaka om under 10 minuter, tillsätt 30 ml fosfatbuffert (4.5), skaka om under 15 minuter och centrifugera. Ta en lämplig del av dekanteringslösningen (supernatanten) och justera pH till 6,5 med natriumhydroxidlösning 1 M (4.8) med hjälp av pH-mätare eller med bromkresolpurpurlösningen (4.10) som indikator.

Späd ut med fosfatbuffert (4.5) så att en förväntad zinkbacitracinhalt av 0,42 IE/ml (= u_8) erhålls.

6.1.2 Proteinkoncentrat

Väg upp 10,0 g av provet, tillsätt 49,0 ml av blandningen (4.4) och 1,0 ml natriumsulfidlösning (4.9) och skaka om hastigt. Kontrollera att pH är cirka 2. Skaka om under 10 minuter. Tillsätt 50 ml fosfatbuffert (4.5), skaka om under 15 minuter och centrifugera. Ta en lämplig volym av dekanteringslösningen (supernatanten) och justera pH till 6,5 med natriumhydroxidlösning 1 M (4.8) med hjälp av pH-mätare eller med bromkresolpurpurlösningen (4.10) som indikator.

Indunsta till cirka halva volymen i rotationsindunstare vid högst 35 °C. Späd med fosfatbuffert (4.5) så att en förväntad zinkbacitracinhalt av 0,42 IE/ml (= u_8) erhålls.

6.1.3 Övriga foder

Väg upp 10,0 g av provet (20,0 g vid en förväntad zinkbacitracinhalt av 5 mg/kg). Tillsätt en blandning av 24,0 ml av blandningen (4.4) och 1,0 ml natriumsulfidlösning (4.9) och homogenisera under 10 minuter. Tillsätt 25 ml fosfatbuffert (4.5), skaka om under 15 minuter och centrifugera. Ta 20 ml av dekanteringslösningen (supernatanten) och justera pH till 6,5 med natriumhydroxidlösning 1 M (4.8) med hjälp av pH-mätare eller med bromkresolpurpurlösningen (4.10) som indikator. Indunsta till cirka 4 ml i rotationsindunstare vid högst 35 °C. Späd återstoden med fosfatbuffert (4.5) så att en förväntad zinkbacitracinhalt av 0,42 IE/ml (= u_8) erhålls.

6.2 *Analyslösningar*

Av lösning u_8 bereds lösningarna u_4 (förväntad halt: 0,21 IE/ml), u_2 (förväntad halt: 0,105 IE/ml) och u_1 (förväntad halt: 0,0525 IE/ml) genom successiv utspädning (1 + 1) med fosfatbuffert (4.5).

7. **Analysmetod**

7.1 *Inokulering av analysmediet*

Inokulera analysmediet (4.2) med bakteriesuspensionen (3.2) vid cirka 50 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med mediet (4.2) vilken mängd av bakteriesuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av zinkbacitracin.

7.2 *Färdigställande av plattorna*

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (s_8, s_4, s_2 och s_1) och av analyslösningen (u_8, u_4, u_2 och u_1). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och lägst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarmediet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av mediet (4.2), som inokulerats enligt 7.1, att ett cirka 2 mm tjockt lager bildas (60 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stelna, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter) i hålen. Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

7.3 *Inkubation*

Inkubera plattorna under 16–18 timmar vid 30 ± 2 °C.

8. **Utvärdering**

Mät hämningszonernas diameter med en noggrannhet av 0,1 mm. För in genomsnittsvärdena för varje koncentration på semilogaritmiskt rutat papper så att logaritmen för koncentrationen i förhållande till hämningszonernas diameter visas. Fastställ optimumlinjerna för såväl standardlösningen som extraktet, t.ex. enligt följande:

Bestäm optimumpunkten för lägsta nivå standardlösning (SL) med formeln:

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

Bestäm optimumpunkten för högsta nivå standardlösning (SH) med formeln:

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut s_1, s_2, s_4 och s_8 mot u_1, u_2, u_4 och u_8 i ovanstående formler.

För in de beräknade värdena för SL och SH på samma papper och förbind dem så att optimumlinjen för standardlösningen erhålls. För på motsvarande sätt in UL och UH och förbind dem så att optimumlinjen för extraktet erhålls.

Om ingen interferens förekommer skall linjerna vara parallella. För praktiska ändamål kan linjerna anses vara parallella om värdena (SH–SL) och (UH–UL) inte avviker med mer än 10 % från sina medelvärden.

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen u_1 och s_1 eller u_8 och s_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med alternativformlerna så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma parallellitetskriterium måste tillfredsställas. Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen för den relativa aktiviteten (log A) med en av följande formler beroende på om tre eller fyra nivåer har använts för att påvisa parallellitet.

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Provextraktets aktivitet = motsvarande standardlösnings aktivitet × A

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

Om den relativa aktiviteten befinns ligga utanför intervallet 0,5–2,0 upprepas analysen med lämpliga justeringar av koncentrationerna av extraktet eller, om detta inte är möjligt, av standardlösningarna. Om den relativa aktiviteten inte kan bringas inom det föreskrivna intervallet måste varje erhållet resultat anses vara approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår måste bestämningen anses vara otillfredsställande.

Uttryck resultatet i milligram zinkbacitracin per kilo foder.

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov av samma analytiker får inte överstiga:

2 mg/kg, absolutvärde, för halter av zinkbacitracin upp till 10 mg/kg,

20 % i förhållande till det högsta värdet vid halter på 10–25 mg/kg,

5 mg/kg, absolutvärde, för halter mellan 25 och 50 mg/kg och

10 % i förhållande till det högsta värdet vid halter över 50 mg/kg."