31984L0004

18.1.1984 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* L 15/28

KOMISJONI DIREKTIIV, 20. detsember 1983, millega muudetakse direktiive 71/393/EMÜ, 72/199/EMÜ ja 78/633/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks

(84/4/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi 70/373/EMÜ söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta ühenduses, ([1]) viimati muudetud Kreeka ühinemisaktiga, eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

komisjoni direktiividega 71/393/EMÜ, ([2]) 72/199/EMÜ ([3]) ja 78/633/EMÜ ([4]) sätestatakse õlide ja rasvade üldsisalduse, virginiamütsiini ja tsinkbatsitratsiini analüüsimeetodid; kõnealused meetodid on vaja asendada teaduse ja tehnika arengut peegeldavate meetoditega;

käesoleva direktiiviga ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Direktiivi 71/393/EMÜ lisa IV osa "Õlide ja rasvade üldsisalduse määramine" asendatakse käesoleva direktiivi I lisaga.

Artikkel 2

Direktiivi 72/199/EMÜ II lisa 5. osa "Virginiamütsiini määramine agarsöötmel difusiooni teel" asendatakse käesoleva direktiivi II lisaga.

Artikkel 3

Direktiivi 78/633/EMÜ lisa 1. osa "Tsinkbatsitratsiini määramine agarsöötmel difusiooni teel" asendatakse käesoleva direktiivi III lisaga.

Artikkel 4

Liikmesriigid jõustavad hiljemalt 1. juuniks 1984 käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid ning teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Artikkel 5

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 20. detsember 1983

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Poul DALSAGER

([1]) EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.
([2]) EÜT L 279, 20.12.1971, lk 7.
([3]) EÜT L 123, 29.5.1972, lk 6.
([4]) EÜT L 206, 29.7.1978, lk 43.

I LISA

"4. **ÕLIDE JA RASVADE ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE**

1. **Eesmärk ja kasutusala**

Käesoleva meetodiga on võimalik määrata õlide ja rasvade üldsisaldust söödas. See ei hõlma nõukogu 22. septembri 1966. aasta määruses 136/66/EMÜ määratletud õliseemnete ja õliviljade analüüsi.

Olenevalt sööda laadist tuleb kasutada ühte kahest kirjeldatud meetodist.

1.1. *Meetod A*

Kasutatakse taimset päritolu lihtsööda puhul, välja arvatud need söödad, mis teadaolevalt sisaldavad õli ja rasva, mida ei ole võimalik petrooleetri abil ilma eelneva hüdrolüüsita täielikult ekstraheerida. Nende hulka kuuluvad gluteenid, pärmid, soja- ja kartulivalgud. Samuti kasutatakse seda meetodit segasöötade puhul, välja arvatud need, mis sisaldavad piimapulbrit või millest ei ole võimalik õli ja rasva petrooleetri abil ilma eelneva hüdrolüüsita täielikult ekstraheerida.

1.2. *Meetod B*

Kasutatakse loomset päritolu lihtsöötade puhul, samuti nende söötade puhul, mida on punktis 1.1 nimetatud kui meetodi A erandeid.

2. **Põhimõte**

2.1. *Meetod A*

Proovi ekstraheeritakse petrooleetriga. Solvent destilleeritakse ja jääk kuivatatakse ning kaalutakse.

2.2. *Meetod B*

Proovi töödeldakse kuumutamisel soolhappega. Segu jahutatakse ja filtreeritakse. Jääk pestakse, kuivatatakse ja seejärel kasutatakse meetodis A kirjeldatud määramist.

3. **Reaktiivid**

3.1. Petrooleeter, keemisvahemik 40–60 °C. Broomiarv peab olema alla 1 ja aurustamisjääk alla 2 mg/100 ml.

3.2. Naatriumsulfaat, veevaba.

3.3. Soolhape, 3N.

3.4. Filtrimise abiaine, nt Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **Seadmed**

4.1. Ekstraheerimisaparaat. Kui see on varustatud sifooniga (Soxhleti aparaat), siis peaks tagasivoolu kiirus olema selline, et tekiks umbes 10 tsüklit tunnis; kui aparaat on ilma sifoonita, siis peaks tagasivoolu kiirus olema ligikaudu 10 ml minutis.

4.2. Ekstraheerimishülsid, milles ei ole petrooleetris lahustuvaid aineid ning mille poorsus vastab punkti 4.1 nõuetele.

4.3. Kuivatuskapp: vaakumkuivatuskapp temperatuuriga 75 ± 3 °C või õhkkuivatuskapp temperatuuriga 100 ± 3 °C.

5. **Analüüsi käik**

5.1. *Meetod A* (vt punkt 8.1)

Kaalutakse 1 mg täpsusega 5 g proovi, pannakse ekstraheerimishülssi (4.2) ja kaetakse rasvavaba vatiga.

Hülss asetatakse ekstraheerimisaparaati (4.1) ja ekstraheeritakse petrooleetriga (3.1) kuus tundi. Petrooleetri ekstrakt kogutakse kuiva kaalutud kolbi, milles on pimsskivitükid. [1]

Solvent destilleeritakse. Aurustumisjääk kuivatatakse, hoides kolbi poolteist tundi kuivatuskapis (4.3). Seejärel lastakse kolvil eksikaatoris jahtuda ja kolb kaalutakse. Kuivatatakse veel 30 minutit veendumaks, et õli ja rasva mass enam ei muutu (massikadu kahe järjestikuse kaalumise vahel peab olema väiksem kui 1 mg).

5.2. *Meetod B*

Kaalutakse 1 mg täpsusega 2,5 g proovi (vt punkt 8.2), pannakse 400milliliitrisesse keeduklaasi või 300milliliitrisesse koonilisse kolbi ning lisatakse 100 ml 3N soolhapet (3.3) ja pimsskivitükke. Keeduklaas kaetakse kellaklaasiga või koonilise kolvi külge ühendatakse püstjahutiga. Segu kuumutatakse nõrga leegi või kuumutusplaadi kohal tasase keemiseni ja keedetakse niimoodi tund aega. Tuleb vältida aine kleepumist nõu seinte külge.

Jahutatakse ja lisatakse selline kogus filtrimise abiainet (3.4), mis on piisav õli- ja rasvakao vältimiseks filtrimisel. Lahus filtritakse läbi niisutatud rasvavaba kahekordse filterpaberi. Jääki pestakse külmas vees kuni filtraadi neutraalse reaktsioonini. Kontrollitakse, et filtraat ei sisalda õli ega rasva. Kui filtraat sisaldab õli või rasva, tuleb proov enne hüdrolüüsi petrooleetriga ekstraheerida, kasutades meetodit A.

Kahekordne filterpaber koos jäägiga asetatakse kellaklaasile ja kuivatatakse kuivatuskapis temperatuuril 100 ± 3 °C poolteist tundi.

Kahekordne filterpaber koos kuivjäägiga asetatakse ekstraheerimishülssi (4.2) ja kaetakse rasvavaba vatiga. Hülss asetatakse ekstraheerimisaparaati (4.1) ja jätkatakse vastavalt punkti 5.1 teisele ja kolmandale lõigule.

6. **Tulemuste väljendamine**

Jäägi mass väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. **Korratavus**

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohiks ületada:

— 0,2 % absoluutarvuna, kui õli ja rasva üldsisaldus on alla 5 %,

— 4,0 % suuremast tulemusest, kui õli ja rasva üldsisaldus on 5–10 %,

— 0,4 % absoluutarvuna, kui õli ja rasva üldsisaldus on üle 10 %.

8. **Märkused**

8.1. Suure õli- ja rasvasisaldusega toodete puhul, mida on raske peenestada või millest ei saa võtta homogeenset vähendatud proovi, toimitakse järgmiselt.

Kaalutakse 1 mg täpsusega 20 g proovi ja segatakse vähemalt 10 g veevaba naatriumsulfaadiga (3.2). Segu ekstraheeritakse petrooleetriga (3.1) vastavalt punktile 5.1. Saadud ekstrakt täiendatakse petrooleetriga (3.1) 500 ml-ni ja segatakse. 50 ml lahust pannakse väiksesse kuiva kaalutud kolbi, milles on pimsskivitükid [1]. Solvent destilleeritakse, segu kuivatatakse ja jätkatakse vastavalt punkti 5.1 viimasele lõigule.

Hülssi jäänud ekstraheerimisjäägist eemaldatakse solvent, jääk peenestatakse tükikeste läbimõõduni 1 mm, pannakse tagasi ekstraheerimishülssi (ilma naatriumsulfaati lisamata) ning jätkatakse vastavalt punkti 5.1. teisele ja kolmandale lõigule.

Õli- ja rasvasisaldus arvutatakse protsendimäärana proovist järgmise valemi abil:

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

kus:

a = jäägi mass grammides pärast esimest ekstraheerimist (alikvootne osa ekstraktist),

b = jäägi mass grammides pärast teist ekstraheerimist.

8.2. Väikese õli- ja rasvasisaldusega toodete puhul võib uuritava proovi massi suurendada 5 grammini.

[1] Kui edaspidi tuleb kontrollida õli või rasva kvaliteeti, kasutatakse pimsskivitükikeste asemel klaashelmeid.”

II LISA

"5. **Virginiamütsiini määramine**

— agarsöötmel difusiooni teel —

1. **Eesmärk ja kasutusala**

Käesolev meetod on virginiamütsiini määramiseks söötades ja eelsegudes. Määramise alampiir on 2 mg/kg (2 miljondikku). [1]

2. **Põhimõte**

Proovi ekstraheeritakse Tween 80 metanoolilahusega. Ekstrakt dekanteeritakse või tsentrifuugitakse ja lahjendatakse. Antibiootilise aktiivsuse määramiseks mõõdetakse virginiamütsiini difusiooni agarsöötmes, millesse on inokuleeritud bakterit *Micrococcus luteus*. Difusiooni näitab mikroorganismi kasvu inhibeerimise tsoonide tekkimine. Nende tsoonide läbimõõt loetakse võrdeliseks antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmiga kasutatud kontsentratsioonide vahemikus.

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

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

Längagari söötmele (4.1) katseklaasis külvatakse bakterit *Micrococcus luteus* ning inkubeeritakse 24 tundi 30 °C juures. Kultuuri hoitakse külmkapis temperatuuril umbes 4 °C. Külvamist korratakse iga kahe nädala tagant.

3.2. *Bakterisuspensiooni valmistamine [a]*

Hiljuti valmistatud längagarilt (3.1) kogutakse kasv 2-3 ml naatriumkloriidi lahuse (4.3) abil. Seda suspensiooni kasutatakse Roux' pudelis oleva 250 ml söötme (4.1) inokuleerimiseks. Inkubeeritakse 18–20 tundi temperatuuril 30 °C. Kasv kogutakse 25 ml naatriumkloriidi lahusesse (4.3) ning segatakse. Suspensioon lahjendatakse vahekorras 1: 10 naatriumkloriidi lahusega (4.3). Suspensiooni läbilaskvus peab olema ligikaudu 75 %, mõõdetuna lainepikkusel 650 nm 1-sentimeetrises küvetis naatriumkloriidi lahuse (4.3) suhtes. See suspensioon säilib temperatuuril 4 °C ühe nädala.

4. **Söötmed ja reaktiivid**

4.1. *Sööde ja määramissööde [b]*

Lihapeptoon	6,0 g
Trüptoon	4,0 g
Pärmiekstrakt	3,0 g
Lihaekstrakt	1,5 g
Glükoos	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vesi	1 000 ml

pH 6,5 (pärast steriliseerimist).

4.2. *Fosfaatpuhver, pH 6*

Dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4	2,0 g
Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4	8,0 g
Vesi	1 000 ml-ni

4.3. 0,8(massi/mahu)protsendiline naatriumkloriidi lahus: 8 g naatriumkloriidi lahustatakse vees ja lahjendatakse 1 000 milliliitrini; steriliseeritakse.

4.4. Metanool.

4.5. Fosfaatpuhvri (4.2) ja metanooli (4.4) segu mahuvahekorras 80/20.

4.6. Tween 80 0,5(massi/mahu)protsendiline lahus metanoolis: lahustada 5 g Tween 80 metanoolis (4.4) ja lahjendada metanooliga 1 000 milliliitrini.

4.7. Standardaine: teadaoleva aktiivsusega virginiamütsiin.

5. **Standardlahused**

Standardaine (4.7) täpne kaalutis lahustatakse metanoolis (4.4) ja lahjendatakse metanooliga (4.4), et saada põhilahus, mis sisaldab 1 000 µg virginiamütsiini ml kohta.

See lahus säilib suletud kolvis 4 °C juures kuni viis päeva.

Kõnealusest põhilahusest valmistatakse seguga (4.5) järjest lahjendades järgmised lahused:

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

6. **Ekstrakti ja määramislahuste valmistamine**

6.1. *Ekstraheerimine*

6.1.1. Tooted virginiamütsiini sisaldusega kuni 100 mg/kg

Kaalutakse 50 g proovi, lisatakse 200 ml lahust (4.6) ja loksutatakse 30 minutit. Jäetakse selginema või tsentrifuugitakse, võetakse 20 ml supernatantlahust ja aurutatakse rootoraurutis temperatuuril kuni 40 °C kokku umbes 5 ml-ni. Jääki lahjendatakse seguga (4.5), et saada virginiamütsiini eeldatavaks sisalduseks 1 µg/ml (= u_8).

6.1.2. Tooted virginiamütsiini sisaldusega üle 100 mg/kg

Kaalutakse kuni 10,0 g proovi, nii et selles sisalduks 1–50 mg virginiamütsiini, lisatakse 100 ml lahust (4.6) ja loksutatakse 30 minutit. Jäetakse selginema või tsentrifuugitakse, seejärel lahjendatakse supernatantlahust seguga (4.5), et saada virginiamütsiini eeldatavaks sisalduseks 1 µg/ml (= u_8).

6.2. *Määramislahused*

Lahusest u_8 valmistatakse seguga (4.5) järjest lahjendades (1: 1) lahused u_4 (eeldatav sisaldus 0,5 µg/ml), u_2 (eeldatav sisaldus 0,25 µg/ml) ja u_1 (eeldatav sisaldus 0,125 µg/ml).

7. **Määramise käik**

7.1. *Määramissöötme inokuleerimine*

Määramissöötmesse (4.1) inokuleeritakse bakterisuspensioon (3.2) temperatuuril umbes 50 °C. Söötme (4.1) plaatidel tehtavate eelkatsetega määratakse kindlaks bakterisuspensiooni kogus, mis on vajalik suurimate ja selgeimate inhibeerimistsoonide saamiseks virginiamütsiini eri kontsentratsioonide juures.

7.2. *Plaatide ettevalmistamine*

Difusiooni läbi agari uuritakse plaatidel standardlahuse nelja kontsentratsiooni juures (s_8, s_4, s_2 ja s_1) ja määramislahuse nelja kontsentratsiooni juures (u_8, u_4, u_2 ja u_1). Need neli ekstrakti ja standardlahuse kontsentratsiooni tuleb tingimata panna igale plaadile. Selleks valitakse plaadid, mis on piisavalt suured, et agarsöötmesse saaks teha vähemalt kaheksa auku läbimõõduga 10–13 mm, mille keskpunktid on üksteisest vähemalt 30 mm kaugusel. Katse võib läbi viia plaatidel, mis koosnevad klaasitahvlist, millele on pandud sileda küljega alumiinium- või plastikrõngas läbimõõduga 200 mm ja kõrgusega 20 mm.

Plaatidele valatakse teatav kogus söödet (4.1), mis on inokuleeritud vastavalt punktile 7.1, nii et tekiks ligikaudu 2 mm paksune kiht (200 millimeetrise läbimõõduga plaadi puhul 60 ml). Söötmel lastakse horisontaalasendis tarduda, tardunud söötmesse tehakse augud ning pannakse nendesse täpselt mõõdetud määramis- ja standardlahuste kogused (0,10–0,15 ml augu kohta, sõltuvalt läbimõõdust). Igal kontsentratsioonil tehakse vähemalt neli katset, nii et iga määramine põhineks vähemalt 32 inhibeerimistsooni hindamisel.

7.3. *Inkubeerimine*

Plaate inkubeeritakse 30 ± 2 °C juures 16–18 tundi.

8. **Hindamine**

Inhibeerimistsoonide läbimõõt mõõdetakse 0,1 mm täpsusega. Iga kontsentratsiooni jaoks saadud keskmised väärtused kantakse poollogaritmilisele millimeetripaberile, et leida kontsentratsiooni logaritmi ja inhibeerimistsooni läbimõõdu vaheline seos. Nii standardlahuse kui ka ekstrakti puhul tõmmatakse läbi punktide "kõige sobivamad" jooned, näiteks nagu on kirjeldatud allpool:

Standardlahuse madalaima kontsentratsiooni (SL) jaoks määratakse "kõige sobivam" punkt, kasutades järgmist valemit:

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

Standardlahuse kõrgeima kontsentratsiooni (SH) jaoks määratakse "kõige sobivam" punkt, kasutades järgmist valemit:

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

Samamoodi arvutatakse "kõige sobivamad" punktid ekstrakti madalaima kontsentratsiooni (UL) ja ekstrakti kõrgeima kontsentratsiooni (UH) jaoks, asendades s_1, s_2, s_4 ja s_8 eespool toodud valemites väärtustega u_1, u_2, u_4 ja u_8.

Arvutatud SL ja SH väärtused märgitakse samale millimeetripaberile ja nende ühendamisel saadakse standardlahuse "kõige sobivam" joon. Samamoodi märgitakse graafikule UL ja UH ning nende ühendamisel saadakse ekstrakti "kõige sobivam" joon.

Segavate mõjude puudumisel peaksid saadud jooned olema paralleelsed. Praktiliselt võib jooni lugeda paralleelseks, kui väärtused (SH–SL) ja (UH–UL) ei erine rohkem kui 10 % võrra nende keskväärtusest.

Kui jooned ei ole paralleelsed, võib visata välja kas u_1 ja s_1 või u_8 ja s_8 ning arvutada SL, SH, UL ja UH järgmiste valemite abil, et saada alternatiivsed "kõige sobivamad" jooned:

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

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

ning samamoodi UL ja UH puhul. Need peaksid vastama samadele paralleelsuse kriteeriumidele. Asjaolu, et tulemus on arvutatud kolme kontsentratsiooni põhjal, tuleb märkida lõpp-protokolli.

Kui jooned loetakse paralleelseks, siis arvutatakse suhtelise aktiivsuse logaritm (log A) ühe alljärgneva valemi abil sõltuvalt sellest, kas paralleelsuse hindamiseks on kasutatud kolme või nelja kontsentratsiooni.

Nelja kontsentratsiooni puhul:

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

Kolme kontsentratsiooni puhul:

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

või

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

Proovi ekstrakti aktiivsus = vastava standardi aktiivsus × A

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

Kui suhteline aktiivsus jääb väljapoole vahemikku 0,5-2,0, siis korratakse määramist, kohandades vastavalt vajadusele ekstrakti kontsentratsiooni või, kui see ei ole võimalik, standardlahuste kontsentratsiooni. Kui suhtelist aktiivsust ei ole võimalik reguleerida nõutud vahemikku, siis tuleb kõiki saadud tulemusi käsitada ligikaudsetena ning see tuleb märkida lõpp-protokolli.

Kui jooni ei saa lugeda paralleelseks, siis korratakse määramist. Kui ka siis ei saada paralleelseid jooni, tuleb määramine lugeda mitterahuldavaks.

Tulemus väljendatakse virginiamütsiini milligrammides sööda kilogrammi kohta.

9. **Korratavus**

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohiks ületada:

— absoluutväärtusena väljendatult 2 mg/kg, kui virginiamütsiini sisaldus on kuni 10 mg/kg,

— 20 % suurimast väärtusest, kui virginiamütsiini sisaldus on 10–25 mg/kg,

— absoluutväärtusena väljendatult 5 mg/kg, kui virginiamütsiini sisaldus on 25–50 mg/kg,

— 10 % suurimast väärtusest, kui virginiamütsiini sisaldus on suurem kui 50 mg/kg.

([1]) 1 mg virginiamütsiini vastab 1 000 Suurbritannias kasutatavale ühikule.

([a]) Kasutada võib ka teisi meetodeid, kui on tehtud kindlaks, et nendega saadakse samalaadsed bakterisuspensioonid.

([b]) Kasutada võib kaubanduses saadaolevat söödet, mis on samalaadse koostisega ning millega saadakse samad tulemused."

III LISA

"1. **TSINKBATSITRATSIINI MÄÄRAMINE**

— agarsöötmel difusiooni teel —

1. **Eesmärk ja kasutusala**

Käesolev meetod on tsinkbatsitratsiini määramiseks söötades ja eelsegudes. Määramise alampiir on 5 mg/kg (5 miljondikku) ([1]).

2. **Põhimõte**

Proovi ekstraheeritakse pH 2 juures metanooli, vee ja soolhappe seguga, millele lisatakse naatriumsulfiidi lahust. Naatriumsulfiidi lisatakse selleks, et sadestada lahustuvad vasesoolad, mis võivad määramist segada. Ekstrakti pH viiakse 6,5 peale, kontsentreeritakse (vajaduse korral) ja lahjendatakse. Ekstrakti antibiootilise aktiivsuse määramiseks mõõdetakse tsinkbatsitratsiini difusiooni agarsöötmes, millesse on inokuleeritud bakterit *Micrococcus luteus (flavus)*. Difusiooni näitab mikroorganismi kasvu inhibeerimise tsoonide tekkimine. Nende tsoonide läbimõõt loetakse võrdeliseks antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmiga kasutatud kontsentratsioonide vahemikus.

3. **Mikroorganism: *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240**

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

Längagari söötmele (4.1) katseklaasis külvatakse bakterit *Micrococcus luteus* (*flavus*) ning inkubeeritakse 24 tundi 30 °C juures. Kultuuri hoitakse külmkapis temperatuuril umbes 4 °C. Külvamist korratakse iga kahe nädala tagant.

3.2. *Bakterisuspensiooni valmistamine* ([a])

Hiljuti valmistatud längagarilt (3.1) kogutakse kasv 2-3 ml naatriumkloriidi lahuse (4.3) abil. Seda suspensiooni kasutatakse Roux' pudelis oleva 250 ml söötme (4.1) inokuleerimiseks. Inkubeeritakse 18-20 tundi temperatuuril 30 °C. Kasv kogutakse 25 ml naatriumkloriidi lahusesse (4.3) ning segatakse. Suspensioon lahjendatakse vahekorras 1: 10 naatriumkloriidi lahusega (4.3). Suspensiooni läbilaskvus peab olema ligikaudu 75 %, mõõdetuna lainepikkusel 650 nm 1-sentimeetrises küvetis naatriumkloriidi lahuse (4.3) suhtes. See suspensioon säilib temperatuuril 4 °C ühe nädala.

4. **Söötmed ja reaktiivid**

4.1. *Sööde* ([b])

Lihapeptoon	6,0 g
Trüptoon	4,0 g
Pärmiekstrakt	3,0 g
Lihaekstrakt	1,5 g
Glükoos	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Vesi	1 000 ml

pH 6,5-6,6 (pärast steriliseerimist).

4.2. *Määramissööde* ([b])

Trüptoon	10,0 g
Pärmiekstrakt	3,0 g
Lihaekstrakt	1,5 g
Glükoos	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Tween 80	1 ml
Vesi	1 000 ml

pH 6,5 (pärast steriliseerimist).

4.3. 0,8(massi/mahu)protsendiline naatriumkloriidi lahus: 8 g naatriumkloriidi lahustatakse vees ja lahjendatakse 1 000 milliliitrini; steriliseeritakse.

4.4. Metanooli, vee ja soolhappe (4.6) segu:

mahuvahekorras 80/17,5/2,5.

4.5. *Fosfaatpuhver, pH 6,5:*

Dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4	22,15 g
Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4	27,85 g
Vesi	1 000 ml-ni

4.6. Soolhape (tihedus: 1,18-1,19).

4.7. Soolhape (0,1M).

4.8. Naatriumhüdroksiidi 1M lahus.

4.9. Naatriumsulfiidi umbes 0,5M lahus.

4.10. Broomkresoolpurpuri lahus 0,04(massi/mahu)protsenti: 0,1 g broomkresoolpurpurit lahustatakse 18,5 ml 0,01M naatriumhüdroksiidi lahuses. Täiendatakse veega 250 ml-ni ja segatakse.

4.11. Standardaine: teadaoleva aktiivsusega (rahvusvahelistes ühikutes, RÜ) tsinkbatsitratsiin.

5. **Standardlahused:**

Kaalutakse selline kogus standardainet tsinkbatsitratsiini (4.11), et see sisaldaks 1 050 RÜ (näidatud aktiivsuse järgi). Lisatakse 5 ml 0,1M soolhapet (4.7) ning lastakse 15 minutit seista. Lisatakse 30 ml vett, fosfaatpuhvri (4.5) abil (kulub umbes 4 ml) viiakse pH 4,5 peale, täiendatakse veega 50 milliliitrini ja segatakse hoolikalt (1 ml = 21 RÜ).

Kõnealusest lahusest valmistatakse fosfaatpuhvriga (4.5) järjest lahjendades järgmised lahused:

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

6. **Ekstrakti ja määramislahuste valmistamine**

6.1. *Ekstraheerimine*

6.1.1. Eelsegud ja mineraalsöödad

Kaalutakse 2,0-5,0 g proovi, lisatakse 29,0 ml segu (4.4) ja 1,0 ml naatriumsulfiidi lahust (4.9) ning loksutatakse lühikest aega. Kontrollitakse, et pH oleks ligikaudu 2. Loksutatakse 10 minutit, lisatakse 30 ml fosfaatpuhvrit (4.5) ning loksutatakse 15 minutit ja tsentrifuugitakse. Võetakse sobiv alikvootne osa supernatantlahust ja viiakse 1M naatriumhüdroksiidi lahusega (4.8) pH 6,5ni, kasutades pH-meetrit või indikaatorina broomkresoolpurpuri lahust (4.10). Lahjendatakse fosfaatpuhvriga (4.5), et saada tsinkbatsitratsiini eeldatavaks sisalduseks 0,42 RÜ/ml (= u_8).

6.1.2. Valgukontsentraadid

Kaalutakse 10,0 g proovi, lisatakse 49,0 ml segu (4.4) ja 1,0 ml naatriumsulfiidi lahust (4.9) ning loksutatakse lühikest aega. Kontrollitakse, et pH oleks ligikaudu 2. Loksutatakse 10 minutit. Lisatakse 50 ml fosfaatpuhvrit (4.5), loksutatakse 15 minutit ja tsentrifuugitakse. Võetakse sobiv kogus supernatantlahust ja viiakse 1M naatriumhüdroksiidi lahusega (4.8) pH 6,5ni, kasutades pH-meetrit või indikaatorina broomkresoolpurpuri lahust (4.10). Aurutatakse rootoraurutis umbes poole mahuni temperatuuril kuni 35 °C.

Lahjendatakse fosfaatpuhvriga (4.5), et saada tsinkbatsitratsiini eeldatavaks sisalduseks 0,42 RÜ/ml (= u_8).

6.1.3. Muud söödad

Kaalutakse 10,0 g proovi (20,0 g proovi, kui tsinkbatsitratsiini eeldatav sisaldus on 5 mg/kg). Lisatakse 24,0 ml segu (4.4) ja 1,0 ml naatriumsulfiidi lahust (4.9) ning homogeniseeritakse 10 minutit. Lisatakse 25 ml fosfaatpuhvrit (4.5), loksutatakse 15 minutit ja tsentrifuugitakse. Võetakse 20 ml supernatantlahust ja viiakse 1M naatriumhüdroksiidi lahusega (4.8) pH 6,5ni, kasutades pH-meetrit või indikaatorina broomkresoolpurpuri lahust (4.10). Aurutatakse rootoraurutis umbes 4 ml-ni temperatuuril kuni 35 °C. Jääki lahjendatakse fosfaatpuhvriga (4.5), et saada tsinkbatsitratsiini eeldatavaks sisalduseks 0,42 RÜ/ml (= u_8).

6.2. *Määramislahused*

Lahusest u_8 valmistatakse fosfaatpuhvriga (4.5) järjest lahjendades (1: 1) lahused u_4 (eeldatav sisaldus 0,21 RÜ/ml), u_2 (eeldatav sisaldus 0,105 RÜ/ml) ja u_1 (eeldatav sisaldus 0,0525 RÜ/ml).

7. **Määramise käik**

7.1. *Määramissöötme inokuleerimine*

Määramissöötmesse (4.2) inokuleeritakse bakterisuspensioon (3.2) temperatuuril umbes 50 °C. Söötme (4.2) plaatidel tehtavate eelkatsetega määratakse kindlaks bakterisuspensiooni kogus, mis on vajalik suurimate ja selgeimate inhibeerimistsoonide saamiseks tsinkbatsitratsiini eri kontsentratsioonide juures.

7.2. *Plaatide ettevalmistamine*

Difusiooni läbi agari uuritakse plaatidel standardlahuse nelja kontsentratsiooni juures (s_8, s_4, s_2 ja s_1) ja määramislahuse nelja kontsentratsiooni juures (u_8, u_4, u_2 ja u_1). Need neli ekstrakti ja standardlahuse kontsentratsiooni tuleb tingimata panna igale plaadile. Selleks valitakse plaadid, mis on piisavalt suured, et agarsöötmesse saaks teha vähemalt kaheksa auku läbimõõduga 10-13 mm, mille keskpunktid on üksteisest vähemalt 30 mm kaugusel. Katse võib viia läbi plaatidel, mis koosnevad klaasitahvlist, millele on pandud sileda küljega alumiinium- või plastikrõngas läbimõõduga 200 mm ja kõrgusega 20 mm.

Plaatidele valatakse teatav kogus söödet (4.2), mis on inokuleeritud vastavalt punktile 7.1, nii et tekiks ligikaudu 2 mm paksune kiht (200 millimeetrise läbimõõduga plaadi puhul 60 ml). Söötmel lastakse horisontaalasendis tarduda, tardunud söötmesse tehakse augud ning pannakse nendesse täpselt mõõdetud määramis- ja standardlahuste kogused (0,10-0,15 ml augu kohta, sõltuvalt läbimõõdust). Igal kontsentratsioonil tehakse vähemalt neli katset, nii et iga määramine põhineks vähemalt 32 inhibeerimistsooni hindamisel.

7.3. *Inkubeerimine*

Plaate inkubeeritakse 30 ± 2 °C juures 16-18 tundi.

8. **Hindamine**

Inhibeerimistsoonide läbimõõt mõõdetakse 0,1 mm täpsusega. Iga kontsentratsiooni jaoks saadud keskmised väärtused kantakse poollogaritmilisele millimeetripaberile, et leida kontsentratsiooni logaritmi ja inhibeerimistsooni läbimõõdu vaheline seos. Nii standardlahuse kui ekstrakti puhul tõmmatakse läbi punktide "kõige sobivamad" jooned, näiteks nagu on kirjeldatud allpool:

Standardlahuse madalaima kontsentratsiooni (SL) jaoks määratakse "kõige sobivam" punkt, kasutades järgmist valemit:

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

Standardlahuse kõrgeima kontsentratsiooni (SH) jaoks määratakse "kõige sobivam" punkt, kasutades järgmist valemit:

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

Samamoodi arvutatakse "kõige sobivamad" punktid ekstrakti madalaima kontsentratsiooni (UL) ja ekstrakti kõrgeima kontsentratsiooni (UH) jaoks, asendades s_1, s_2, s_4 ja s_8 eespool toodud valemites väärtustega u_1, u_2, u_4 ja u_8.

Arvutatud SL ja SH väärtused märgitakse samale millimeetripaberile ja nende ühendamisel saadakse standardlahuse "kõige sobivam" joon. Samamoodi märgitakse graafikule UL ja UH ning nende ühendamisel saadakse ekstrakti "kõige sobivam" joon.

Segavate mõjude puudumisel peaksid saadud jooned olema paralleelsed. Praktiliselt võib jooni lugeda paralleelseks, kui väärtused (SH–SL) ja (UH–UL) ei erine rohkem kui 10 % võrra nende keskväärtusest.

Kui jooned ei ole paralleelsed, siis võib visata välja kas u_1 ja s_1 või u_8 ja s_8 ning arvutada SL, SH, UL ja UH järgmiste valemite abil, et saada alternatiivsed "kõige sobivamad" jooned:

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

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

ning samamoodi UL ja UH puhul. Need peaksid vastama samadele paralleelsuse kriteeriumidele. Asjaolu, et tulemus on arvutatud kolme kontsentratsiooni põhjal, tuleb märkida lõpp-protokolli.

Kui jooned loetakse paralleelseks, siis arvutatakse suhtelise aktiivsuse (A) logaritm (log A) ühe alljärgneva valemi abil sõltuvalt sellest, kas paralleelsuse hindamiseks on kasutatud kolme või nelja kontsentratsiooni.

Nelja kontsentratsiooni puhul:

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

Kolme kontsentratsiooni puhul:

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

või

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

Proovi ekstrakti aktiivsus = vastava standardi aktiivsus × A

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

Kui suhteline aktiivsus jääb väljapoole vahemikku 0,5-2,0, siis korratakse määramist, kohandades vastavalt vajadusele ekstrakti kontsentratsiooni või, kui see ei ole võimalik, standardlahuste kontsentratsiooni. Kui suhtelist aktiivsust ei ole võimalik reguleerida nõutud vahemikku, siis tuleb kõiki saadud tulemusi käsitada ligikaudsetena ning see tuleb märkida lõpp-protokolli.

Kui jooni ei saa lugeda paralleelseks, siis korratakse määramist. Kui ka siis ei saada paralleelseid jooni, siis tuleb määramine lugeda mitterahuldavaks.

Tulemus väljendatakse tsinkbatsitratsiini milligrammides sööda kilogrammi kohta.

9. **Korratavus**

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohiks ületada:

— absoluutväärtusena väljendatult 2 mg/kg, kui tsinkbatsitratsiini sisaldus on kuni 10 mg/kg,

— 20 % suurimast väärtusest, kui tsinkbatsitratsiini sisaldus on 10-25 mg/kg,

— absoluutväärtusena väljendatult 5 mg/kg, kui tsinkbatsitratsiini sisaldus on 25-50 mg/kg;

— 10 % suurimast väärtusest, kui tsinkbatsitratsiini sisaldus on suurem kui 50 mg/kg.

([1]) 1 mg söödas olevat tsinkbatsitratsiini vastab 42 rahvusvahelisele ühikule (RÜ).

([a]) Kasutada võib ka teisi meetodeid, kui on tehtud kindlaks, et nendega saadakse samalaadsed bakterisuspensioonid.

([b]) Kasutada võib kaubanduses saadaolevat söödet, mis on samalaadse koostisega ning millega saadakse samad tulemused.”