31984L0004

1984.1.18. *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* L 15/28

A BIZOTTSÁG IRÁNYELVE
(1983. december 20.)
a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló 71/393/EGK, 72/199/EGK és 78/633/EGK irányelvek módosításáról

(84/4/EGK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb Görögország csatlakozási okmányával módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i 70/373/EGK ([1]) tanácsi irányelvre és különösen annak 2. cikkére,

mivel a 71/393/EGK ([2]), a 72/199/EGK ([3]) és a 78/633/EGK ([4]) bizottsági irányelvek meghatározzák a nyersolajokra és zsírokra, a virginiamicinre és cinkbacitracinra vonatkozó analitikai módszereket; mivel szükségessé vált ezen módszerek felváltása a tudományos és technikai ismeretek fejlődését követő módszerekkel;

mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A 71/393/EGK irányelv mellékletének IV. része „Nyersolajok és zsírok meghatározása” helyébe ezen irányelv I. melléklete lép.

2. cikk

A 72/199/EGK irányelv II. mellékletének 5. része „Virginiamicin agardiffúzióval történő meghatározása” helyébe ezen irányelv II. melléklete lép.

3. cikk

A 78/633/EGK irányelv mellékletének 1. része „Cink bacitracin agardiffúzióval történő meghatározása” helyébe ezen irányelv III. melléklete lép.

4. cikk

A tagállamok legkésőbb 1984. június 1-jéig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek, és erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

5. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1983. december 20-án.

a Bizottság részéről

Poul DALSAGER

a Bizottság tagja

([1]) HL L 170., 1970.8.3., 2. o.
([2]) HL L 279., 1971.12.20., 7. o.
([3]) HL L 123., 1972.5.29., 6. o.
([4]) HL L 206., 1978.7.29., 43. o.

1. MELLÉKLET

„4. **NYERSOLAJOK ÉS ZSÍROK MEGHATÁROZÁSA**

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányok nyersolaj- és zsírtartalmának meghatározását. Nem vonatkozik az 1966. szeptember 22-i 136/66/EGK tanácsi rendeletben meghatározott olajos magvak és olajtartalmú gyümölcsök analízisére.

A takarmány jellegétől függően a leírt két módszer valamelyikét kell használni.

1.1. *A-módszer*

Növényi eredetű egynemű takarmányokra alkalmazható, azok kivételével, amelyekről tudjuk, hogy előzetes hidrolízis nélkül, petroléterrel teljesen nem extrahálható olajokat és zsírokat tartalmaznak. Ilyen kivételek a sikérek, élesztők, szója- és burgonyafehérjék. Ez a módszer összetett takarmányokra is alkalmazható, azok kivételével, amelyek tejport tartalmaznak, vagy amelyekből az olajokat és zsírokat előzetes hidrolízis nélkül petroléterrel nem lehet teljesen kivonni.

1.2. *B-módszer*

Állati eredetű egynemű takarmányokra, valamint az 1.1. pontban az A-módszer alóli kivételekként említett takarmányokra alkalmazható.

2. **Vizsgálati alapelv**

2.1. *A módszer*

A mintát petroléterrel extraháljuk. Az oldószert bepároljuk és a maradékot szárítjuk, majd lemérjük.

2.2. *B módszer*

A mintát hevítés közben sósavval kezeljük. A keveréket lehűtjük és leszűrjük. A maradékot mossuk, megszárítjuk, majd elvégezzük az A-módszer szerinti meghatározást.

3. **Reagensek**

3.1. Petroléter, forrási tartomány 40–60°C. A brómértéknek 1-nél, az bepárlás utáni maradéknak 2 mg/100 ml-nél kevesebbnek kell lennie.

3.2. Nátrium-szulfát, vízmentes.

3.3. Sósav 3 N.

3.4. Szűrési segédanyag, például Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **Eszközök**

4.1. Extraháló készülék. Ha szifonnal felszerelt (Soxhlet készülék), akkor a visszafolyatási (reflux) foknak olyannak kell lennie, ami óránként 10 munkaciklust végez; ha nem szifonos típusú, akkor a visszafolyatási foknak 10 ml/perc körül kell lennie.

4.2. Extraháló tartályok, amelyek petroléterben oldható anyagot nem tartalmaznak, valamint a 4.1. pont kívánalmainak megfelelő porozitással bírnak.

4.3. Szárító kemence, amely lehet 75 ± 3 °C-ra beállított vákuumos kemence, vagy 100 ± 3 °C-ra beállított légkeveréses kemence.

5. **Vizsgálat módja**

5.1. *A-módszer* (lásd 8.1 pont)

Mérjünk ki 1 mg pontossággal 5 g mintát, öntsük át egy extraháló tartályba (4.2) és fedjük le zsírmentes vattapamaccsal.

Helyezzük a tartályt az extraktorba (4.1) és petroléterrel (3.1) hat órán át extraháljuk. A petroléter-kivonatot vegyük fel egy horzsakődarabokat ([1]) tartalmazó száraz, lemért lombikba.

Pároljuk be az oldószert. Szárítsuk ki a bepárlási maradékot, a lombikot másfél órán keresztül a szárító kemencében (4.3) tartva. Hagyjuk kihűlni a szárítóban, majd mérjük le. Szárítsuk újra 30 percen keresztül, annak biztosítására, hogy az olajok és zsírok tömege állandó marad (két egymást követő mérés közötti tömegveszteségnek 1 mg-nál kevesebbnek kell lennie).

5.2. *B módszer*

Mérjünk ki 1 mg pontossággal 2,5 g mintát (lásd 8.2 pont), helyezzük egy 400 ml-es főzőpohárba, vagy egy 300 ml-es Erlenmeyer-lombikba, majd adjunk hozzá 100 ml 3N sósavat (3.3) és horzsakődarabokat. A főzőpoharat fedjük le óraüveggel, vagy a Erlenmeyer-lombikra szereljünk fel egy visszafolyós hűtőt. A keveréket kis lángon vagy főzőlapon lassan forraljuk és egy órán át tartsuk így. Ne engedjük az anyagot az edény oldalaihoz ragadni.

Hűtsük le, majd adjunk hozzá a szűrés során történő olaj- és zsírveszteség megelőzéséhez elegendő szűrési segédanyagot (3.4). Szűrjük át egy nedvesített, zsírmentes dupla szűrőpapíron. A maradékot mossuk tiszta vízzel addig, amíg semleges szüredéket nem kapunk. Ellenőrizzük, hogy a szüredék nem tartalmaz olajat vagy zsírt. A jelenlétük azt jelzi, hogy a mintát a hidrolízis előtt, az A-módszerrel, petroléterrel kell extrahálni.

Helyezzük a maradékot tartalmazó dupla szűrőpapírt egy óraüvegre, majd szárítsuk másfél órán át a kemencében 100 ± 3 °C-on.

Helyezzük a száraz maradékot tartalmazó dupla szűrőpapírt egy extrakciós tartályba (4.2) és fedjük le zsírmentes vattapamaccsal. Helyezzük a tartályt egy extraktorba (4.1) és az 5.1 pont második és harmadik bekezdéseiben jelzetteknek megfelelően járjunk el.

6. **Az eredmény kifejezése**

A maradék tömegét a mintára vonatkoztatva, százalékosan fejezzük ki.

7. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon mintán, ugyanazon analitikus által, párhuzamosan végzett két meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– az 5 % alatti nyersolaj és zsírtartalmaknál a 0,2 %-ot, abszolút értékben,
– az 5-10 % közötti tartalmak legmagasabb eredményére vonatkozóan a 4,0 %-ot,
– a 10 % feletti nyersolaj és zsírtartalmaknál a 0,4 %-ot, abszolút értékben.

8. **Észrevételek**

8.1. Azoknál a magas olaj- és zsírtartalmú termékeknél, amelyek őrlése nehézkes, vagy alkalmatlanok egy homogén, csökkentett tesztminta kinyerésére, a következők szerint járjunk el:

Mérjünk ki 1 mg pontossággal 20 g mintát, majd ezt keverjük össze 10 g vagy annál több vízmentes nátrium-szulfáttal (3.2). Az 5.1 pontban leírtak szerint extraháljuk petroléterrel (3.1). A kapott kivonatot töltsük fel petroléterrel (3.1) 500 ml-re, majd homogenizáljuk. Helyezzünk 50 ml oldatot egy száraz, lemért, horzsakődarabokat ([2]) tartalmazó kis lombikba. Pároljuk be az oldószert, szárítsuk, majd az 5.1 pont utolsó bekezdésében leírtak szerint járjunk el.

A tartályban maradt extrakciós maradványból távolítsuk el az oldószert, a maradványt őröljük 1 mm-es finomságúra, helyezzük vissza az extrakciós tartályba (ne adjunk hozzá nátrium-szulfátot), majd az 5.1 pont második és harmadik bekezdéseiben leírtak szerint járjunk el.

Az olaj és zsírtartalmat a minta százalékaként határozzuk meg, a következő képlet segítségével:

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

ahol:

a = az első extrakció utáni maradvány tömege grammban (a kivonat aliquot része),

b = a második extrakció utáni maradvány tömege grammban.

8.2. Az alacsony olaj- és zsírtartalmú terméknél a vizsgálati minta 5 grammig növelhető.

([1]) Amennyiben az olaj vagy a zsír további minőségi próbákon megy keresztül, akkor a habkődarabok helyett üveggyöngyöket használjunk.
([2]) Amennyiben az olaj vagy a zsír további minőségi próbákon megy keresztül, akkor a habkődarabok helyett üveggyöngyöket használjunk.”

2. MELLÉKLET

„5. **Virginiamicin meghatározása**

– agar táptalajon történő diffúzióval –

1. **Cél és alkalmazási terület**

A módszer a virginiamicin takarmányokban és előkeverékekben történő meghatározására szolgál. A meghatározás alsó határa 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát Tween 80 metilalkoholos oldatával extraháljuk. A kivonatot dekantáljuk vagy centrifugáljuk, majd felhígítjuk. Antibiotikus aktivitását a virginiamicin Micrococcus luteussal beoltott agar táptalajban történő diffúziójának mérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus gátlási zónáinak képződése jelzi. Ezeknek a zónáknak az átmérője egyenes arányosnak tekinthető az antibiotikum-koncentrációnak az alkalmazott antibiotikum-koncentrációk tartományával szembeni logaritmusával.

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

3.1. *A törzstenyészet fenntartása*

Oltsunk be ferde táptalajokat (4.1) tartalmazó csöveket Micrococcus luteussal, majd inkubáljuk 30 °C-on 24 órán át. A tenyészetet hűtőgépben tároljuk, 4 °C körüli hőmérsékleten. Kéthetenként oltsuk át.

3.2. *A baktériumszuszpenzió elkészítése* ([a])

2-3 ml nátrium-klorid oldat (4.3) segítségével gyűjtsük be egy nemrégiben elkészített ferde agarról (3.1) a növekményt. Ezzel a szuszpenzióval oltsunk be 250 ml, Roux lombikban lévő táptalajt (4.1) és inkubáljuk 30 °C-on 18–20 órán át. Gyűjtsük be a növekményt 25 ml nátrium-klorid (4.3) oldatban, majd keverjük össze. Hígítsuk fel a szuszpenziót nátrium-klorid oldattal (4.3) 1/10 arányban. A szuszpenziónak a 650 nm-en, 1 cm-es cellában mért fényáteresztő képessége a nátrium-klorid (4.3) ellenében 75 % körüli kell, hogy legyen. Ez a szuszpenzió 4 °C körüli hőmérsékleten egy hétig tárolható.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *Alap- és vizsgálati táptalaj* ([b])

Hús pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Élesztőkivonat	3,0 g
Húskivonat	1,5 g
Glükóz	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Víz	1 000 ml
pH 6,5 (sterilizálás után)	

4.2. *Foszfátpuffer, pH 6*

Kálium-hidrogén-foszfát K_2HPO_4	2,0 g
Kálium-dihidrogén-foszfát KH_2PO_4	8,0 g
Vízzel kiegészítve	1 000 ml-re

4.3. 0,8 %-os (w/v) nátrium-klorid oldat: oldjunk fel vízben 8 g nátrium-kloridot, majd hígítsuk 1 000 ml-re; sterilizáljuk.

4.4. Metil-alkohol.

4.5. Foszfátpuffer (4.2)/metil-alkohol (4.4) keveréke: 80/20 (v/v)

4.6. Tween 80 0,5 %-os (w/v) metil-alkoholos oldata: oldjunk fel metil-alkoholban 5 g Tween 80-at, majd metil-alkohollal hígítsuk 1 000 ml-re.

4.7. Standard anyag: ismert aktivitású virginiamicin.

5. **Standard oldatok**

Oldjuk fel a standard anyag (4.7) pontosan kimért mennyiségét metil-alkoholban (4.4) majd hígítsuk fel metil-alkohollal, hogy 1 000 µg/ml virginiamicint tartalmazó törzsoldatot kapjunk.

Lezárt lombikban 4 °C-on tárolva az oldat 5 napig eltartható.

Ebből a törzsoldatból, a keverékkel (4.5) történő egymást követő hígításokkal készítsük el a következő oldatokat:

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

6. **A kivonat és a vizsgálati oldatok elkészítése**

6.1. *Extrakció*

6.1.1. 100 mg/kg vagy az alatti virginiamicintartalmú termékek.

Mérjünk ki 50 g mintát, adjunk hozzá 200 ml oldatot (4.6), majd rázzuk 30 percig. Hagyjuk leülepedni vagy centrifugáljuk, majd vegyünk ki a felülúszó oldatból 20 ml-t és azt egy rotációs bepárlóban, 40 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten pároljuk be körülbelül 5 ml-re. A maradékot hígítsuk fel a keverékkel (4.5), hogy megközelítőleg 1 µg/ml virginiamicin-tartalmat (= u_8) kapjunk.

6.1.2. 100 mg/kg-nál nagyobb virginiamicintartalmú termékek.

Mérjünk ki 10,0 g-ot meg nem haladó mintamennyiséget a mintából, amely 1 és 50 mg közötti virginiamicint tartalmaz, adjunk hozzá 100 ml oldatot (4.6), majd rázzuk 30 percig. Hagyjuk leülepedni vagy centrifugáljuk, majd a felülúszó oldatot hígítsuk fel a keverékkel (4.5), hogy megközelítőleg 1 µg/ml virginiamicintartalmat (= u_8) kapjunk.

6.2. *Vizsgálati oldatok*

Az u_8 oldatból a keverékkel (4.5) történő egymást követő hígítással (1 + 1) készítsünk u_4 (várható tartalom: 0,5 µg/ml), u_2 (várható tartalom: 0,25 µg/ml) és u_1 (várható tartalom: 0,125 µg/ml) oldatokat.

7. **A vizsgálat módja**

7.1. *A vizsgálati táptalaj beoltása*

Oltsuk be a vizsgálati táptalajt (4.1) a baktériumszuszpenzióval (3.2), körülbelül 50 °C-on. A vizsgálati táptalajt (4.1) tartalmazó lemezeken végzett előzetes vizsgálatokkal határozzuk meg azt a szükséges baktériumszuszpenzió-mennyiséget, amely a különböző virginiamicinkoncentrációkkal a legnagyobb és legtisztább gátlási zónákat adja.

7.2. *A lemezek elkészítése*

Az agardiffúziót a négy standard oldat koncentrációjával (s_8, s_4, s_2, és s_1) és a négy vizsgálati oldat koncentrációjával (u_8, u_4, u_2, u_1) öntött lemezeken végezzük. A standard és a kivonat ezen négy-négy koncentrációját minden egyes lemezre fel kell vinni. Ezért megfelelő nagyságú lemezeket kell választanunk ahhoz, hogy az agar táptalajban legalább nyolc darab, 10-13 mm átmérőjű, egymástól legalább 30 mm távolságra lévő lyukat alakíthassunk ki. A vizsgálat olyan lemezeken végezhető el, amelyek egy üveglapból és egy annak tetejére helyezett, 200 mm átmérőjű és 20 mm magas csiszolt alumínium vagy műanyag karimagyűrűből állnak.

A lemezekre öntsünk annyi, a 7.1 pont szerint beoltott táptalajt (4.1), hogy az egy körülbelül 2 mm vastagságú réteget alkosson (200 mm átmérőjű lemez esetében ez 60 ml). Hagyjuk egyenletesen eloszlani, fúrjuk ki a lyukakat, és helyezzük el bennük a vizsgálati és standard oldatok pontosan kimért mennyiségeit (az átmérő függvényében lyukanként 0,10 és 0,15 ml közötti mennyiség). Minden koncentrációt legalább négyszer alkalmazzunk, hogy minden meghatározás 32 gátlási zóna kiértékelése alapján történjen.

7.3. *Inkubáció*

Inkubáljuk a lemezeket 30 ± 2 °C-on, 16–18 órán át.

8. **Kiértékelés**

Mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét 0,1 mm-es pontossággal. Fél-logaritmikus milliméterpapírra jegyezzük fel az egyes koncentrációknál mért eredmények középértékeit, jelezve a koncentrációk logaritmusát a gátlási zónák átmérőivel összefüggésben. Szerkesszük meg mind a standard oldat, mind a kivonat regreszsziós vonalát, például az alábbiak szerint:

Határozzuk meg a standard legalacsonyabb szint (SA) regressziós pontját a következő képlet segítségével:

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

Határozzuk meg a standard legmagasabb szint (SM) regressziós pontját a következő képlet segítségével:

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

Hasonló módon számítsuk ki a regressziós pontokat a kivonat legalacsonyabb szintjére (UA) és a kivonat legmagasabb szintjére (UM), a fenti képletekben az s_1, s_2, s_4 és s_8 értékek helyett az u_1, u_2, u_4 és u_8 értékeket használva.

Jegyezzük fel a kiszámított SA és SM értékeket ugyanarra a milliméterpapírra és kössük össze őket, hogy megkapjuk a standard oldat regressziós vonalát. Hasonló módon jegyezzük fel az UA és UM értékeket és kössük össze őket, hogy megkapjuk a kivonat regressziós vonalát.

Ha interferencia nem lép fel, a vonalaknak párhuzamosnak kell lenniük. Gyakorlati megfontolásból a vonalakat párhuzamosnak tekinthetjük, ha az (SM – SA) és (UM – UA) érték középértékeiktől való eltérése nem haladja meg a 10 %-ot.

Ha a vonalak nem tekinthetőek párhuzamosnak, akkor akár az u_1 és s_1, akár az u_8 és s_8 elhagyható, az SA, SM, UA és UM értékek az alternatív képletekkel számolhatók ki, hogy megkapjuk az alternatív regressziós vonalakat:

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

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

és hasonló módon az UA-ra és UM-ra vonatkozóan. Ugyanazt a párhuzamossági feltételt kell teljesíteni. Azt a tényt, hogy az eredmény három tényező alapján került kiszámításra, fel kell tüntetni a zárójelentésben.

Ha a vonalak párhuzamosnak tekinthetőek, akkor számoljuk ki a relatív aktivitás logaritmusát (log A) a következő képletek egyikének felhasználásával, attól függően, hogy három vagy négy tényezőből történt-e a párhuzamosság megállapítása.

Négy tényező esetén

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

Három tényező esetén

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

vagy

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

A mintakivonat aktivitása = a vonatkozó standard aktivitása × A

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

Ha a relatív aktivitás a 0,5 és 2,0 közötti tartományon kívül esik, akkor ismételjük meg a vizsgálatot a kivonat koncentrációin, vagy ahol ez nem lehetséges, ott a standard oldatokon végzett megfelelő módosításokkal. Ha a relatív aktivitást nem tudjuk az említett tartományon belülre korrigálni, akkor bármely kapott eredményt közelítő eredménynek kell tekinteni, és ezt fel kell tüntetni a zárójelentésben.

Ha a vonalak nem tekinthetőek párhuzamosnak, ismételjük meg a meghatározást. Ha a párhuzamosságot még ezután nem sikerült elérni, akkor a meghatározást nem kielégítőnek kell tekinteni.

Az eredményt milligrammban kifejezett virginiamicinre és kilogrammban kifejezett takarmányra vonatkoztatva fejezzük ki.

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon mintán, ugyanazon analitikus által párhuzamosan végrehajtott két meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– a 10 mg/kg alatti virginiamicin-tartalom esetén a 2 mg/kg-ot, abszolút értékben,
– a 10 és 25 mg/kg közötti tartalom esetén a legmagasabb érték 20 %-át,
– a 25 és 50 mg/kg közötti tartalom esetén az 5 mg/kg-ot, abszolút értékben,
– az 50 mg/kg feletti tartalom esetén a legmagasabb érték 10 %-át.

([1]) 1 mg virginiamycin 1 000 UK egységnek felel meg.
([a]) Más módszerek is alkalmazhatók feltéve, hogy megállapítást nyert, hogy azok hasonló baktériumszuszpenziókat eredményeznek.
([b]) Minden hasonló összetételű és ugyanezeket az eredményeket adó kereskedelmi táptalaj felhasználható."

3. MELLÉKLET

„1. **CINK BACITRACIN MEGHATÁROZÁSA**

– agar táptalajon végzett diffúzióval –

1. **Cél és alkalmazási terület**

A módszer a cink bacitracin takarmányokban és előkeverékekben történő meghatározására szolgál. A meghatározás alsó határa 5 mg/kg (5 ppm) ([1]).

2. **Vizsgálati alapelv**

A pH 2-es mintát metil-alkohol/víz/sósav keverékével és nátrium-szulfid oldattal extraháljuk. A nátrium-szulfid hozzáadása a vizsgálat során esetleg interferenciát eredményező oldható réz-sók kicsapatására szolgál. A kivonatot beállítjuk pH 6,5-re, koncentráljuk (szükség esetén) és felhígítjuk. Antibiotikus aktivitását a cink bacitracin Micrococcus luteussal (flavussal) beoltott agar táptalajon végzett diffúziójának mérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus gátlási zónáinak képződése mutatja. Ezeknek a zónáknak az átmérője egyenes arányban áll az antibiotikum-koncentrációnak az alkalmazott antibiotikum-koncentrációk tartománya feletti logaritmusával.

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

3.1. *A törzstenyészet fenntartása*

Oltsunk be ferde táptalajokat (4.1) tartalmazó csöveket Micrococcus luteussal (flavus), majd inkubáljuk 30 °C-on 24 órán át. A tenyészetet hűtőgépben tároljuk, 4 °C körüli hőmérsékleten. Kéthetenként oltsuk át.

3.2. *A baktériumszuszpenzió elkészítése* ([a])

2-3 ml nátrium-klorid oldat (4.3) segítségével gyűjtsük be egy nemrégiben elkészített ferde agarról (3.1) a növekményt. Ezzel a szuszpenzióval oltsunk be 250 ml, Roux-lombikban lévő táptalajt (4.1) és inkubáljuk 30 °C-on 18–20 órán át. Gyűjtsük be a növekményt 25 ml nátrium-klorid oldatban (4.3), majd keverjük össze. Hígítsuk fel a szuszpenziót nátrium-klorid oldattal (4.3) 1:10 arányban. A szuszpenziónak 650 nm-en, 1 cm-es cellában, a nátrium-klorid oldat (4.3) ellenében mért fényáteresztő képessége 75 % körüli kell, hogy legyen. Ez a szuszpenzió 4 °C körüli hőmérsékleten egy hétig tárolható.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *Alaptáptalaj* ([b])

Hús pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Élesztőkivonat	3,0 g
Húskivonat	1,5 g
Glükóz	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Víz	1 000 ml
pH 6,56,6 (sterilizálás után)	

4.2. *Vizsgálati táptalaj* ([b])

Tripton	10,0 g
Élesztőkivonat	3,0 g
Húskivonat	1,5 g
Glükóz	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Tween 80	1 ml
Víz	1 000 ml
pH 6,5 (sterilizálás után)	

4.3. 0,8 %-os (w/v) nátrium-klorid oldat: oldjunk fel vízben 8 g nátrium-kloridot, majd hígítsuk 1 000 ml-re; sterilizáljuk.

4.4. Metil-alkohol/víz/sósav keveréke (4.6):

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

4.5. *Foszfátpuffer, pH 6,5:*

Kálium–hidrogén-foszfát K_2HPO_4	22,15 g
Kálium-dihidrogén-foszfát KH_2PO_4	27,85 g
Vízzel kiegészítve	1 000 ml-re

4.6. Sósav (d: 1,18-1,19).

4.7. Sósav (0,1 M).

4.8. Nátrium-hidroxid 1 M oldat.

4.9. Nátrium-szulfid, körülbelül 0,5 M oldat.

4.10. Brómkrezol lila oldat 0,04 % (w/v): oldjunk fel 0,1 g brómkrezol lilát 18,5 ml 0,01 M nátrium-hidroxid oldatban. Töltsük fel vízzel 250 ml-re, majd keverjük össze.

4.11. Standard anyag: ismert aktivitású cink bacitracin (n.e.-ben).

5. **Standard oldatok**

Mérjünk ki (a jelzett aktivitás szerint) 1 050 n.e.-nek megfelelő standard cink bacitracint (4.11). Adjunk hozzá 5 ml 0,1 M sósavat (4.7) és 15 percig hagyjuk állni. Adjunk hozzá 30 ml vizet, foszfátpufferrel (4.5) (kb. 4 ml) állítsuk be pH 4,5-re, vízzel töltsük fel 50 ml-re, majd alaposan keverjük össze (1 ml = 21 n.e.).

Ebből a törzsoldatból, foszfátpufferrel (4.5) történő egymást követő hígítással készítsük el a következő oldatokat:

s_8	0,42	n.e./ml
s_4	0,21	n.e./ml
s_2	0,105	n.e./ml
s_1	0,0525	n.e./ml

6. **A kivonat és a vizsgálati oldatok elkészítése**

6.1. *Extrakció*

6.1.1. előkeverékek és ásványi takarmányok

Mérjünk ki 2,0- 5,0 g mintát, adjunk hozzá 29,0 ml-t a keverékből (4.4), valamint 1,0 ml nátrium-szulfid oldatot (4.9), majd rázassuk rövid ideig. Ellenőrizzük, hogy a pH érték 2 körül legyen. Rázzuk 10 percig, majd adjunk hozzá 30 ml foszfátpuffert (4.5), rázzuk 15 percig, majd centrifugáljuk. A felülúszó oldatból vegyünk egy megfelelő aliquot mennyiséget és pH-mérő vagy brómkrezol lila oldat (4.10) indikátor segítségével, 1 M nátrium-hidroxid oldattal (4.8) állítsuk be a pH-t 6,5-re. Hígítsuk fel foszfátpufferrel (4.5), hogy megközelítően 0,42 n.e./ml cink bacitracin tartalmat (= u_8) kapjunk.

6.1.2. Fehérjekoncentrátumok

Mérjünk ki 10,0 g mintát, adjunk hozzá 49,0 ml-t a keverékből (4.4) valamint 1,0 ml nátrium-szulfid oldatot (4.9), majd rázassuk rövid ideig. Ellenőrizzük, hogy a pH-érték 2 körül legyen. Rázzuk 10 percig, majd adjunk hozzá 50 ml foszfátpuffert (4.5), rázzuk 15 percig, majd centrifugáljuk. A felülúszó oldatból vegyünk egy megfelelő mennyiséget és pH-mérő vagy brómkrezol lila oldat (4.10) indikátor segítségével, 1 M nátrium-hidroxid oldattal (4.8) állítsuk be a pH-t 6,5-re. Rotációs bepárlóban, 35 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten pároljuk be körülbelül a mennyiség felét.

Hígítsuk fel foszfátpufferrel (4.5), hogy megközelítőleg 0,42 n.e./ml cink bacitracin tartalmat (= u_8) kapjunk.

6.1.3. Egyéb takarmányok

Mérjünk ki 10,0 g mintát (20 grammot 5 mg/kg-os várt cink bacitracin tartalom esetében). Adjunk hozzá 24,0 ml-t a keverékből (4.4), valamint 1,0 ml nátrium-szulfid oldatot (4.9), majd 10 percig homogenizáljuk. Adjunk hozzá 25 ml foszfátpuffert (4.5), rázzuk 15 percig, majd centrifugáljuk. A felülúszó oldatból vegyünk 20 ml-t és pH-mérő vagy brómkrezol lila oldat (4.10) indikátor segítségével, 1 M nátrium-hidroxid oldattal (4.8) állítsuk be a pH-t 6,5-re. Rotációs bepárlóban,35 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten pároljunk be körülbelül 4 ml-re. A maradék anyagot hígítsuk fel foszfátpufferrel (4.5), hogy 0,42 n.e./ml-es várt cink bacitracin tartalmat (= u_8) kapjunk.

6.2. *Vizsgálati oldatok*

Az u_8 oldatból a foszfátpufferrel (4.5) való egymást követő hígításokkal (1 + 1) készítsünk u_4 (várt tartalom: 0,21 n.e./ml), u_2 (várt tartalom: 0,105 n.e./ml) és u_1 (várt tartalom: 0,0525 n.e./ml) oldatokat.

7. **A vizsgálati módja**

7.1. *A vizsgálati táptalaj beoltása*

Oltsuk be a vizsgálati táptalajt (4.2) a baktériumszuszpenzióval (3.2), körülbelül 50 °C-on. A vizsgálati táptalajjal (4.2) öntött lemezeken végzett előzetes vizsgálatokkal határozzuk meg azt a szükséges baktériumszuszpenzió mennyiséget, amely a különböző cink bacitracin koncentrációkkal a legnagyobb és legtisztább gátlási zónákat adja.

7.2. *A lemezek elkészítése*

Az agardiffúziót a négy standard oldat koncentrációjával (s_8, s_4, s_2, s_1) és a négy vizsgálati oldat koncentrációjával (u_8, u_4, u_2, u_1) öntött lemezeken végezzük. A standardnak és a kivonatnak ezt a négy-négy koncentrációját minden egyes lemezre fel kell vinnünk. Ezért megfelelő nagyságú lemezeket kell választanunk ahhoz, hogy az agar táptalajban legalább nyolc darab, 10-13 mm átmérőjű, egymástól legalább 30 mm távolságra lévő lyukat alakíthassunk ki. A vizsgálat olyan lemezeken végezhető el, amelyek egy üveglapból és egy annak tetejére helyezett 200 mm átmérőjű és 20 mm magas csiszolt alumínium vagy műanyag karimagyűrűből állnak.

A lemezekre öntsünk annyi, a 7.1 pont szerint beoltott táptalajt (4.2), hogy az egy körülbelül 2 mm vastagságú réteget alkosson (200 mm átmérőjű lemez esetében ez 60 ml). Hagyjuk egyenletesen eloszlani, fúrjuk ki a lyukakat, és helyezzük el bennük a vizsgálati és standard oldatok pontosan kimért mennyiségeit (az átmérő függvényében lyukanként 0,10-0,15 ml). Minden koncentrációt legalább négyszer alkalmazzunk, hogy minden meghatározás 32 gátlási zóna kiértékelése alapján történjen.

7.3. *Inkubáció*

Inkubáljuk a lemezeket 30 ± 2 °C-on, 16–18 órán át.

8. **Kiértékelés**

Mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét 0,1 mm-es pontossággal. Fél-logaritmikus milliméterpapírra jegyezzük fel az egyes koncentrációknál mért eredmények középértékeit, jelezve a koncentrációknak a gátlási zónák átmérőihez vonatkoztatott logaritmusát. Szerkesszük meg mind a standard oldat, mind a kivonat regressziós vonalát, például az alábbiak szerint:

Határozzuk meg a standard legalacsonyabb szint (SA) regressziós pontját a következő képlet segítségével:

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

Határozzuk meg a standard legmagasabb szint (SM) regressziós pontját a következő képlet segítségével:

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

Hasonló módon számítsuk ki a regressziós pontokat a kivonat legalacsonyabb szintjére (UA) és a kivonat legmagasabb szintjére (UM), a fenti képletekben az s_1, s_2, s_4 és s_8 értékek helyett az u_1, u_2, u_4 és u_8 értékeket használva.

Jegyezzük fel a kiszámított SA és SM értékeket ugyanarra a milliméterpapírra és kössük össze őket, hogy megkapjuk a standard oldat regressziós vonalát. Hasonló módon jegyezzük fel az UA és UM értékeket és kössük össze őket, hogy megkapjuk a kivonat regressziós vonalát.

Ha interferencia nem lép fel, a vonalaknak párhuzamosnak kell lenniük. Gyakorlati megfontolásból a vonalakat párhuzamosnak tekinthetjük, ha az (SM – SA) és (UM – UA) érték középértékeiktől való eltérése nem haladja meg a 10 %-ot.

Ha a vonalak nem tekinthetőek párhuzamosnak, akkor akár az u_1 és s_1, akár az u_8 és s_8 elhagyható, és az SA, SM, UA és UM értékek alternatív képletekkel számolhatók ki, hogy megkapjuk az alternatív regressziós vonalakat:

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

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

és hasonló módon az UA-ra és UM-ra vonatkozóan. Ugyanazt a párhuzamossági feltételt kell teljesíteni. Azt a tényt, hogy az eredmény három tényező alapján került kiszámításra, fel kell tüntetni a zárójelentésben.

Ha a vonalak párhuzamosnak tekinthetőek, akkor számoljuk ki a relatív aktivitás (A) logaritmusát (log A) a következő képletek egyikének felhasználásával, attól függően, hogy három vagy négy tényező alapján történt-e a párhuzamosság megállapítása.

Négy tényező esetén

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

Három tényező esetén

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

vagy

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

A mintakivonat aktivitása = a vonatkozó standard aktivitása x A

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

Ha a relatív aktivitás a 0,5 és 2,0 közötti tartományon kívül esik, akkor ismételjük meg a vizsgálatot a kivonat koncentrációin, vagy ahol ez nem lehetséges, ott a standard oldatokon végzett megfelelő módosításokkal. Ha a relatív aktivitást nem tudjuk az előírt tartományon belülre korrigálni, akkor bármely kapott eredményt közelítő eredménynek kell tekinteni, és ezt fel kell tüntetni a zárójelentésen.

Ha a vonalak nem tekinthetőek párhuzamosnak, meg kell ismételni a meghatározást. Ha a párhuzamosságot még ezután nem sikerült elérni, akkor a meghatározást nem kielégítőnek kell tekinteni.

Az eredményt milligrammban kifejezett cink bacitracinre és kilogrammban kifejezett takarmányra vonatkoztatva fejezzük ki.

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon mintán, ugyanazon analitikus által párhuzamosan végzett két meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– a 10 mg/kg alatti cink bacitracin tartalom esetén a 2 mg/kg-ot, abszolút értékben,

– a 10 és 25 mg/kg közötti tartalom esetén a legmagasabb érték 20 %-át,

– a 25 és 50 mg/kg közötti tartalom esetén az 5 mg/kg-ot, abszolút értékben,

– az 50 mg/kg feletti tartalom esetén a legmagasabb érték 10 %-át.

---

(1) 1 mg cink bacitracin takarmányszint 42 nemzetközi egységnek (n.e.) felel meg.

(a) Más módszerek is alkalmazhatók feltéve, hogy megállapítást nyert, hogy azok hasonló baktériumszuszpenziókat eredményeznek.

(b) Minden hasonló összetételű és ugyanezeket az eredményeket adó kereskedelmi táptalaj felhasználható.

(c) Minden hasonló összetételű és ugyanezeket az eredményeket adó kereskedelmi táptalaj felhasználható.”