31984L0004

KOMISIJAS DIREKTĪVA
(1983. gada 20. decembris),
ar kuru groza Direktīvas 71/393/EEK, 72/199/EEK un 78/633/EEK, ar ko nosaka Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei

(84/4/EEK)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu 70/373/EEK par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei [1], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Grieķijas Pievienošanās aktu, un jo īpaši tās 2. pantu,

tā kā Komisijas Direktīvas 71/393/EEK [2], 72/199/EEK [3] un 78/633/EEK [4] nosaka kopeļļu un koptauku, virginiamicīna un cinka bacitracīna analīžu metodes; tā kā nav vajadzības šīs metodes aizstāt ar citām metodēm, kas izstrādātas zinātnes un tehnikas attīstības rezultātā;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Direktīvas 71/393/EEK pielikuma IV daļu "Kopeļļu un koptauku noteikšana" aizstāj ar šīs direktīvas I pielikumu.

2. pants

Direktīvas 72/199/EEK II pielikuma 5. daļu "Virginiamicīna noteikšana agara barotnē ar difūzijas metodi" aizstāj ar šīs direktīvas II pielikumu.

3. pants

Direktīvas 78/633/EEK pielikuma 1. daļu "Cinka bacitracīna noteikšana agara barotnē ar difūzijas metodi" aizstāj ar šīs direktīvas III pielikumu.

4. pants

Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības līdz 1984. gada 1. jūnijam. Tās par to tūlīt informē Komisiju.

5. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1983. gada 20. decembrī

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Poul DALSAGER

---

[1] OV L 170, 3.8.1970., 2. lpp.
[2] OV L 279, 20.12.1971., 7. lpp.
[3] OV L 123, 29.5.1972., 6. lpp.
[4] OV L 206, 29.7.1978., 43. lpp.

I PIELIKUMS

"4. **KOPEĻĻU UN KOPTAUKU NOTEIKŠANA**

1. **Mērķis un joma**

Šī metode ļauj noteikt kopeļļas un koptaukus barībā. Tā neattiecas uz Padomes 1966. gada 22. septembra Regulā 136/66/EEK minēto eļļas augu sēklu un eļļas augu augļu analīzēm.

Atkarībā no barības īpašībām, jāizmanto kāda no abām turpmāk aprakstītajām metodēm.

1.1. *A metode*

Metode izmantojama augu izcelsmes barības analīzēm, izņemot tos šādas barības veidus, kas satur eļļas un taukus, kas bez iepriekšējas hidrolīzes nav pilnībā ekstrahējami ar petrolēteri. Šādas taukvielas satur lipeklis, raugs, soja un kartupeļu proteīni. Metode izmantojama arī barības maisījumu analīzēm, izņemot tos šādas barības veidus, kas satur piena pulveri, vai kuros esošās taukvielas bez iepriekšējas hidrolīzes nav pilnībā ekstrahējamas ar petrolēteri.

1.2. *B metode*

Metode izmantojama dzīvnieku izcelsmes barības analīzēm, kā arī to 1.1. punktā minēto barības veidu analīzēm, ko nevar veikt pēc A metodes.

2. **Princips**

2.1. *A metode*

Paraugu ekstrahē ar petrolēteri. Pēc šķīdinātāja atdestilēšanas atlikumu izžāvē un nosver.

2.2. *B metode*

Paraugu, vārot, apstrādā ar sālsskābi. Maisījumu atdzesē un filtrē. Atlikumu skalo, žāvē un veic noteikšanu pēc A metodes.

3. **Reaģenti**

3.1. Petrolēteris, viršanas temperatūra: no 40 līdz 60 °C. Tā broma skaitlim jābūt mazākam par 1 un negaistošajam atlikumam mazākam par 2 mg/100 ml.

3.2. Bezūdens nātrija sulfāts.

3.3. Sālsskābe, 3 N.

3.4. Filtrēšanas materiāls, piemēram, kizelgurs vai *Hyflo-supercel*.

4. **Aparatūra**

4.1. Ekstrakcijas aparāti. Ekstraktoros ar sifonu (Soksleta aparāts) atteces ātrumam būtu jānodrošina aptuveni 10 ekstrakcijas cikli stundā; ekstraktoros bez sifona vēlamais atteces ātrums ir apmēram 10 ml minūtē.

4.2. Ekstrakcijas uzgaļi, kas attīrīti no petrolēterī šķīstošām vielām un kuru porozitāte atbilst 4.1. punktā noteiktajām prasībām.

4.3. Uz 75 ± 3 °C darba temperatūru ieregulēts vakuuma žāvēšanas skapis vai uz 100 ± 3 °C ieregulēts parastais žāvēšanas skapis.

5. **Procedūra**

5.1. *A metode* (skat. 8.1. punktu)

Ar precizitāti līdz 1 mg iesver 5 g parauga, ko pārnes ekstrakcijas uzgalī (4.2.) un pārklāj ar attaukotas vates tamponu.

Uzgali ievieto ekstraktorā (4.1.) un sešas stundas veic ekstrakciju ar petrolēteri (3.1.). Petrolētera ekstraktu savāc sausā, nosvērtā kolbā, kurā ievietoti pumeka gabaliņi [1].

Atdestilē šķīdinātāju. Neiztvaikojušo atlikumu izžāvē, kolbu uz pusotru stundu ievietojot žāvēšanas skapī (4.3.). Kolbu atdzesē eksikatorā un nosver. Atkārtoti žāvē 30 minūtes, līdz eļļu un tauku masa nemainās (divos secīgi veiktos svērumos masas zudumam jābūt mazākam par 1 mg.).

5.2. *B metode*

Ar precizitāti līdz 1 mg (skat. 8.2. punktu) iesver 2,5 g parauga, ko ievieto 400 ml tilpuma vārglāzē vai 300 ml tilpuma koniskajā kolbā, pievieno 100 mililitrus 3N sālsskābes (3.3.) un pumeka gabaliņus. Vārglāzi nosedz ar pulksteņstiklu vai koniskajai kolbai pievieno atteces dzesinātāju. Maisījumu uzkarsē līdz viršanas temperatūrai un vienu stundu lēni vāra uz nelielas gāzes degļa liesmas vai elektriskās plītiņas. Produktam neļauj pielipt pie trauka sienām.

Atdzesē un pievieno tādu daudzumu filtrēšanas materiāla (3.4.), kas novērš eļļu un tauku zudumus filtrēšanas laikā. Filtrē caur samitrinātu, attaukotu, dubultu filtrpapīru. Atlikumu mazgā aukstā ūdenī līdz filtrāta neitrālai reakcijai. Pārbauda, vai filtrātā nav eļļu vai tauku. Ja filtrātā ir taukvielas, paraugs pirms hidrolīzes jāekstrahē ar petrolēteri pēc A metodes.

Dubulto filtrpapīru ar atlikumu pēc filtrēšanas novieto uz pulksteņstikla un pusotru stundu žāvē 100 ± 3 °C temperatūrā žāvēšanas skapī.

Divkārtīgo filtrpapīru ar izžāvēto atlikumu pēc filtrēšanas ievieto ekstrakcijas uzgalī (4.2.) un pārklāj ar attaukotas vates tamponu. Uzgali ievieto ekstraktorā (4.1.) un rīkojas, kā noteikts 5.1. punkta otrajā un trešajā daļā.

6. **Rezultātu izteikšana**

Atlikuma masu izsaka procentos no parauga masas.

7. **Atkārtojamība**

No viena parauga viena operatora paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

— 0,2 % pēc absolūtā lieluma, ja taukvielu saturs ir mazāks par 5 %,

— 4 % no lielākā rezultāta skaitliskās vērtības, ja taukvielu saturs ir no 5 līdz 10 %,

— 0,4 % pēc absolūtā lieluma, ja taukvielu saturs ir lielāks par 10 %.

8. **Piezīmes**

8.1. Produktiem ar augstu eļļas un tauku saturu, kas ir grūti sasmalcināmi vai no kā nevar sagatavot viendabīgu samazinātu testa paraugu, to nosaka šādi.

Ar precizitāti līdz 1 mg iesver 20 g parauga un to sajauc ar 10 g vai vairāk bezūdens nātrija sulfāta (3.2.). Ekstrahē ar petrolēteri (3.1.), kā noteikts 5.1. punktā. Iegūto ekstraktu atšķaida līdz 500 ml tilpumam ar petrolēteri (3.1.) un homogenizē. Ņem 50 ml šķīduma, ko pārnes nelielā, sausā, nosvērtā kolbā, kurā ir pumeka gabaliņi ([1]). Atdestilē šķīdinātāju, izžāvē un rīkojas, kā noteikts 5.1. punkta pēdējā daļā.

Izdala šķīdinātāju no uzgalī palikušajiem ekstrakcijas atlikumiem, ko sasmalcina līdz 1 mm un pēc tam ievieto atpakaļ ekstrakcijas uzgalī (nepievieno nātrija sulfātu), un rīkojas, kā noteikts 5.1. punkta otrajā un trešajā daļā.

Eļļu un tauku saturu procentos no parauga masas aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

a = ekstrakcijas atlikuma masa gramos pēc pirmās ekstrakcijas (ekstrakta alikvota daļa);

b = atlikuma masa gramos pēc otrās ekstrakcijas.

8.2. Produktiem ar zemu eļļu un tauku saturu testa paraugu var palielināt līdz 5 g.

([1]) Ja eļļai vai taukiem jāizdara turpmākas kvalitātes pārbaudes, pumeka gabaliņu vietā lieto stikla lodītes."

II PIELIKUMS

"5. **Virginiamicīna noteikšana**

— agara barotnē ar difūzijas metodi —

1. **Mērķis un joma**

Metode paredzēta virginiamicīna noteikšanai barībā un premiksos. Noteikšanas zemākā robeža ir 2 mg/kg (2 ppm) (1).

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar *Tween 80* šķīdumu metanolā. Ekstraktu dekantē vai centrifugē un atšķaida. Tā antibiotisko aktivitāti nosaka, novērtējot virginiamicīna difūziju agara vidē, kas apsēta ar *Micrococcus luteus*. Difūziju nosaka pēc mikroorganisma kavēšanas zonām. Pieņem, ka izmantojamo antibiotisko vielu koncentrāciju intervālā šo zonu diametrs ir tieši proporcionāls antibiotikas koncentrācijai.

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

3.1. *Tīrkultūras uzturēšana*

Mēģenēs uz slīpagara kultivēšanas barotnes (4.1.) izsēj *Micrococcus luteus* un inkubē 24 stundas 30 °C temperatūrā. Kultūru glabā ledusskapī apmēram 4 °C temperatūrā. Pārsēj reizi divās nedēļās.

3.2. *Baktēriju suspensijas pagatavošana* (a)

Ar 2–3 ml nātrija hlorīda šķīduma (4.3.) noskalo pieaugumu no nesen pagatavota slīpagara (3.1.). Šo suspensiju izmanto 250 ml kultivēšanas barotnes (4.1.) apsēšanai Rū (*Roux*) kolbā, ko inkubē 18 līdz 20 stundas 30 °C temperatūrā. Pieaugumu noskalo ar 25 ml nātrija hlorīda šķīduma un samaisa. Sagatavo suspensijas desmitkārtīgu atšķidījumu nātrija hlorīda šķīdumā (4.3.). Suspensijas gaismas caurlaidībai pie 650 nm, mērot 1 cm kivetē pret nātrija hlorīda (4.3.) šķīdumu, jābūt 75 %. Šo suspensiju apmēram 4 °C temperatūrā var glabāt vienu nedēļu.

4. **Kultivēšanas barotne un reaģenti**

4.1. *Kultivēšanas un pārbaudes barotne* (b)

Gaļas peptons	6,0 g
Triptons	4,0 g
Rauga ekstrakts	3,0 g
Gaļas ekstrakts	1,5 g
Glikoze	1,0 g
Agars	10,0 līdz 20,0 g
Ūdens	1 000 ml
pH 6,5 (pēc sterilizēšanas)	

4.2. *Fosfātu buferšķīdums, pH 6*

Kālija hidrogēnfosfāts, K_2HPO_4	2,0 g
Kālija dihidrogēnfosfāts, KH_2PO_4	8,0 g
Ūdens līdz	1 000 ml

4.3. Nātrija hlorīda 0,8 % (m/V) šķīdums: ūdenī izšķīdina 8 g nātrija hlorīda un atšķaida līdz 1 000 ml; sterilizē.

4.4. Metanols.

4.5. Fosfātu buferšķīduma (4.2.) un metanola (4.4.) maisījums: 80/20 (V/V).

4.6. *Tween 80* 0,5 % (m/V) šķīdums metanolā: metanolā (4.4.) izšķīdina 5 g *Tween 80* un atšķaida ar metanolu līdz 1 000 ml.

4.7. Standartviela: virginiamicīns ar zināmu aktivitāti.

5. **Standartšķīdumi**

Metanolā (4.4.) izšķīdina precīzu standartvielas (4.7.) iesvaru un atšķaida ar metanolu (4.4.) tā, lai iegūtu rezerves standartšķīdumu, kas satur 1 000 µg virginiamicīna mililitrā.

Glabājot aizkorķētā kolbā 4 °C temperatūrā, šis šķīdums ir stabils līdz piecām dienām.

Šo rezerves šķīdumu pakāpeniski atšķaidot ar maisījumu (4.5.), pagatavo šādus šķīdumus:

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

6. **Ekstrakta un pārbaudes šķīdumu sagatavošana**

6.1. *Ekstrakcija*

6.1.1. Produkti ar virginiamicīna saturu līdz 100 mg/kg

Iesver 50 g parauga, pievieno 200 ml šķīduma (4.6.) un krata 30 minūtes. Nostādina vai centrifugē, ņem 20 ml dzidrā šķīduma un temperatūrā, kas nepārsniedz 40 °C, rotācijas tvaicētājā ietvaicē līdz 5 ml tilpumam. Ietvaicēto šķīdumu atšķaida ar maisījumu (4.5.) tā, lai tajā būtu aptuveni 1 µg/ml virginiamicīna (= u_8).

6.1.2. Produkti ar virginiamicīna saturu virs 100 mg/kg

Ņem līdz 10,0 g lielu paraugu, kas satur 1–50 mg virginiamicīna, pievieno 100 ml šķīduma (4.6.) un krata 30 minūtes. Nostādina vai centrifugē, tad atšķaida ar maisījumu (4.5.) tā, lai šķīdumā būtu aptuveni 1 µg/ml virginiamicīna (= u_8).

6.2. *Pārbaudes šķīdumi*

No šķīduma u_8 pagatavo šķīdumus u_4 (aptuvenā koncentrācija: 0,5 µg/ml), u_2 (aptuvenā koncentrācija: 0,25 µg/ml) un u_1 (aptuvenā koncentrācija: 0,125 µg/ml), tos pakāpeniski atšķaidot (1 + 1) ar maisījumu (4.5.).

7. **Pārbaudes procedūra**

7.1. *Pārbaudes barotnes apsēšana*

Aptuveni 50 °C temperatūrā pārbaudes barotni (4.1.) apsēj ar baktēriju suspensiju (3.2.). Iepriekšējos izmēģinājumos uz plātnēm ar barotni (4.1.) nosaka baktēriju suspensijas daudzumu, kas vajadzīgs lielāko un skaidrāko mikroorganismu kavēšanas zonu iegūšanai ar dažādas koncentrācijas virginiamicīna šķīdumiem.

7.2. *Plātņu sagatavošana*

Difūziju caur agaru izdara uz plātnēm ar četru dažādu koncentrāciju standartšķīdumiem (s_8, s_4, s_2 un s_1) un četru koncentrāciju pārbaudes šķīdumiem (u_8, u_4, u_2 un u_1). Šo četru koncentrāciju ekstrakta šķīdumiem un standartšķīdumiem noteikti jābūt uz katras plātnes. Šim nolūkam izvēlas pietiekami lielas plātnes, uz kurām agara barotnē var izveidot vismaz astoņus iedobumus 10–13 mm diametrā, kuru centri ir attālināti vismaz par 30 mm. Testu var veikt uz plātnes, kas izveidota no stikla loksnes, uz kuras uzlikts 20 mm augsts anodēta alumīnija vai plastmasas riņķis ar 200 mm diametru.

Plātnēs salej tādu daudzumu barotnes (4.1.), kas apsēta saskaņā ar 7.1. punktu, lai iegūtu apmēram 2 mm biezu slāni (60 ml uz plātni ar 200 mm diametru). Atstāj sastingt horizontālā stāvoklī, izveido iedobumus un tajos precīzi izmērītā daudzumā iepilda pārbaudes šķīdumus un standartšķīdumus (no 0,10 līdz 0,15 ml iedobumā, atkarībā no diametra). Katru koncentrāciju pārbauda vismaz četras reizes, un tādējādi katrā analīzē jānovērtē vismaz 32 kavēšanas zonas.

7.3. *Inkubēšana*

Plātnes inkubē 16 – 18 stundas 30 ± 2 °C temperatūrā.

8. **Novērtēšana**

Ar precizitāti līdz 0,1 mm izmēra kavēšanas zonu diametru. Uz puslogaritmiskā papīra atzīmē punktus, kas atbilst kavēšanas zonu vidējam diametram atkarībā no koncentrācijas. Uzzīmē "atbilstošākās" līknes attiecīgi standartšķīdumam un ekstraktam, piemēram, šādi:

aprēķina "atbilstošāko" punktu standarta zemākajam līmenim (SL) pēc formulas:

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

aprēķina "atbilstošāko" punktu standarta augstākajam līmenim (SH) pēc formulas:

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

Līdzīgi aprēķina "atbilstošākos" punktus ekstrakta koncentrācijas zemākajam līmenim (UL) un augstākajam līmenim (UH), norādītajās formulās s_1, s_2, s_4 un s_8 aizstājot attiecīgi ar u_1, u_2, u_4 un u_8.

Tajā pašā grafikā atzīmē aprēķinātos SL un SH lielumus un tos savieno, iegūstot standartšķīdumam "atbilstošāko" līniju. Līdzīgi atzīmē UL un UH, ko savieno, iegūstot ekstraktam "atbilstošāko" līniju.

Ja nav nekādu traucējošu faktoru, abām līnijām vajadzētu būt paralēlām. Praktisku apsvērumu dēļ līnijas var uzskatīt par paralēlām, ja (SH–SL) un (UH–UL) neatšķiras vairāk par 10 % no to vidējā lieluma.

Konstatējot, ka līnijas nav paralēlas, var atmest u_1 un s_1 vai u_8 un s_8 un SL, SH, UL un UH "atbilstošākās" līknes var aprēķināt pēc alternatīvām formulām:

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

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

un līdzīgi aprēķina UL un UH. Jāievēro tie paši paralelitātes kritēriji. Ja rezultāti aprēķināti pēc trim līmeņiem, to norāda gala ziņojumā.

Ja līnijas uzskata par paralēlām, atkarībā no tā, vai paralelitāte novērtēta pēc trim vai četriem līmeņiem, aprēķina relatīvās aktivitātes logaritmu (log A), izmantojot vienu no šādām formulām.

Pēc četriem līmeņiem:

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

Pēc trim līmeņiem:

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

vai

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

Parauga ekstrakta aktivitāte = attiecīgā standartšķīduma aktivitāte × A

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

Ja relatīvā aktivitāte ir zemāka par 0,5 vai augstāka par 2,0, pārbaudi izdara atkārtoti, attiecīgi koriģējot ekstrakta koncentrācijas, bet, ja tas nav iespējams, tad koriģējot standartšķīdumu koncentrācijas. Ja nevar panākt, ka relatīvā aktivitāte ir vajadzīgajās robežās, iegūtais rezultāts uzskatāms par aptuvenu, un tas būtu jānorāda gala ziņojumā.

Ja nevar uzskatīt, ka līnijas ir paralēlas, noteikšanu izdara atkārtoti. Ja nevar panākt paralelitāti, noteikšana jāuzskata par neatbilstošu.

Rezultātu izsaka miligramos virginiamicīna uz barības kilogramu.

9. **Atkārtojamība**

No viena parauga viena operatora paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirība nedrīkst pārsniegt:

— 2 mg/kg pēc absolūtā lieluma, ja virginiamicīna saturs nepārsniedz 10 mg/kg,
— 20 % no augstākā lieluma, ja virginiamicīna saturs ir no 10 līdz 25 mg/kg,
— 5 mg/kg pēc absolūtā lieluma, ja virginiamicīna saturs ir no 25 līdz 50 mg/kg,
— 10 % no augstākā lieluma, ja virginiamicīna saturs pārsniedz 50 mg/kg.

([1]) 1 mg virginiamicīna atbilst 1 000 UK vienībām.
([a]) Var izmantot citas metodes ar nosacījumu, ka ir pierādīts, ka tās dod līdzīgas baktēriju suspensijas.
([b]) Var izmantot līdzīga sastāva gatavas nopērkamas barotnes, ar kurām iegūst tādus pašus rezultātus."

III PIELIKUMS

"1. **CINKA BACITRACĪNA NOTEIKŠANA**

— agara barotnē ar difūzijas metodi —

1. **Mērķis un joma**

Metode paredzēta cinka bacitracīna noteikšanai barībā un premiksos. Noteikšanas zemākā robeža ir 5 mg/kg (5 ppm) [1].

2. **Princips**

Paraugu pie pH 2 ekstrahē ar metanola/ūdens/sālsskābes maisījumu un ar nātrija sulfīda šķīdumu. Nātrija sulfīdu pievieno, lai izgulsnētu šķīstošos vara sāļus, kas var traucēt pārbaudi. Ekstrakta reakciju noregulē līdz pH 6,5, to koncentrē (ja vajadzīgs) un atšķaida. Tā antibiotisko aktivitāti novērtē, nosakot cinka bacitracīna difūziju agara vidē, kas apsēta ar *Micrococcus luteus (flavus)*. Difūziju nosaka pēc mikroorganisma kavēšanas zonu izveidošanās. Pieņem, ka izmantojamo antibiotisko vielu koncentrāciju intervālā šo zonu diametrs ir tieši proporcionāls antibiotikas koncentrācijai.

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

3.1. *Tīrkultūras uzturēšana*

Mēģenēs uz slīpagara kultivēšanas barotnes (4.1.) izsēj *Micrococcus luteus (flavus)* un inkubē 24 stundas 30 °C temperatūrā. Kultūru glabā ledusskapī apmēram 4 °C temperatūrā. Pārsēj reizi divās nedēļās.

3.2. *Baktēriju suspensijas pagatavošana* [a]

Ar 2-3 ml nātrija hlorīda šķīduma (4.3.) noskalo pieaugumu no nesen pagatavota slīpagara (3.1.). Šo suspensiju izmanto 250 ml kultivēšanas barotnes (4.1.) apsēšanai Rū (*Roux*) kolbā, ko inkubē 18 līdz 20 stundas 30 °C temperatūrā. Pieaugumu noskalo ar 25 ml nātrija hlorīda šķīduma un samaisa. Atšķaida suspensiju 1/10 ar nātrija hlorīda šķīdumu (4.3.). Suspensijas gaismas caurlaidībai pie 650 nm, mērot 1 cm kivetē pret nātrija hlorīda (4.3.) šķīdumu, jābūt 75 %. Šo suspensiju apmēram 4 °C temperatūrā var glabāt vienu nedēļu.

4. **Kultivēšanas barotne un reaģenti**

4.1. *Kultivēšanas barotne* [b]

Gaļas peptons	6,0 g
Triptons	4,0 g
Rauga ekstrakts	3,0 g
Gaļas ekstrakts	1,5 g
Glikoze	1,0 g
Agars	10,0 līdz 20,0 g
Ūdens	1 000 ml
pH 6,5 līdz 6,6 (pēc sterilizēšanas)	

4.2. *Pārbaudes vide* [b]

Triptons	10,0 g
Rauga ekstrakts	3,0 g
Gaļas ekstrakts	1,5 g
Glikoze	1,0 g
Agars	10,0 līdz 20,0 g
Tween 80	1 ml
Ūdens	1 000 ml
pH 6,5 (pēc sterilizēšanas)	

4.3. Nātrija hlorīda 0,8 % (m/V) šķīdums: ūdenī izšķīdina 8 g nātrija hlorīda un atšķaida līdz 1 000 ml; sterilizē.

4.4 Metanola/ūdens/sālsskābes maisījums (4.6.):

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

4.5. *Fosfātu buferšķīdums, pH 6,5*:

Kālija hidrogēnfosfāts, K_2HPO_4	22,15 g.
Kālija dihidrogēnfosfāts, KH_2PO_4	27,85 g.
Ūdens līdz	1 000 ml.

4.6. Sālsskābe (d:1,18 līdz 1,19).

4.7. Sālsskābe (0,1 M)

4.8. Nātrija hidroksīds, 1 M šķīdums.

4.9. Nātrija sulfīda aptuveni 0,5 M šķīdums.

4.10. Bromkrezola purpura krāsvielas 0,04 % (m/V) šķīdums: izšķīdina 0,1 g bromkrezola purpura krāsvielas 18,5 ml nātrija hidroksīda 0,01 M šķīdumā. Uzpilda ar ūdeni līdz 250 ml tilpumam un sajauc.

4.11. Standartviela: cinka bacitracīns ar zināmu aktivitāti (IV).

5. **Standartšķīdumi**

Iesver standarta cinka bacitracīnu (4.11.) daudzumā, kas atbilst 1 050 IV (saskaņā ar norādīto aktivitāti). Pievieno 5 ml 0,1 M sālsskābes (4.7.) un 15 minūtes nostādina. Pievieno 30 ml ūdens, noregulē pH līdz 4,5 ar fosfātu buferšķīdumu (4.5.) (apmēram 4 ml), ar ūdeni uzpilda līdz 50 ml tilpumam un labi sajauc (1ml = 21 IV).

No šā šķīduma, to pakāpeniski atšķaidot ar fosfātu buferšķīdumu (4.5.), pagatavo šādus šķīdumus:

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

6. **Ekstrakta un pārbaudes šķīdumu pagatavošana**

6.1. *Ekstrakcija*

6.1.1. Premiksi un minerālbarība

No parauga ņem 2,0 - 5,0 g lielu iesvaru, pievieno 29,0 ml maisījuma (4.4.) un 1,0 ml nātrija sulfīda šķīduma (4.9.) un sakrata. Pārbauda, lai pH ir apmēram 2. Krata 10 minūtes, pievieno 30 ml fosfātu buferšķīduma (4.5.), krata 15 minūtes un centrifugē. Ņem piemērotu alikvotu dzidrā šķīduma un noregulē tā pH līdz 6,5 ar 1 M nātrija hidroksīda šķīdumu, indikācijai izmantojot pH-metru vai bromkrezola purpura krāsvielas šķīdumu (4.10.). Atšķaida ar fosfātu buferšķīdumu (4.5.) tā, lai cinka bacitracīna saturs būtu 0,42 IV/ml (= u_8).

6.1.2. Proteīna koncentrāti

No parauga ņem 10,0 g iesvaru, pievieno 49,0 ml maisījuma (4.4.) un 1,0 ml nātrija sulfīda šķīduma (4.9.) un sakrata. Pārbauda, vai pH ir apmēram 2. Krata 10 minūtes, pievieno 50 ml fosfātu buferšķīduma (4.5.), krata 15 minūtes un centrifugē. Ņem piemērotu alikvotu dzidrā šķīduma un noregulē tā pH līdz 6,5 ar 1 M nātrija hidroksīda šķīdumu, indikācijai izmantojot pH-metru vai bromkrezola purpura krāsvielas šķīdumu (4.10.). Ietvaicē pusi tilpuma rotācijas tvaicētājā temperatūrā, kas nepārsniedz 35 °C.

Atšķaida ar fosfātu buferšķīdumu (4.5.) tā, lai cinka bacitracīna saturs būtu 0,42 IV/ml (= u_8).

6.1.3. Citi barības veidi

No parauga ņem 10,0 g iesvaru (vai 20,0 g, ja cinka bacitracīna saturs barībā ir aptuveni 5 mg/kg). Pievieno 24,0 ml maisījuma (4.4.) un 1,0 ml nātrija sulfīda šķīduma (4.9.), un homogenizē 10 minūtes. Pievieno 25 ml fosfātu buferšķīduma (4.5.), krata 15 minūtes un centrifugē. Ņem 20 ml alikvotu dzidrā šķīduma un noregulē tā pH līdz 6,5 ar 1 M nātrija hidroksīda šķīdumu, indikācijai izmantojot pH-metru vai bromkrezola purpura krāsvielas šķīdumu (4.10.). Ietvaicē līdz apmēram 4 ml tilpumam rotācijas tvaicētājā temperatūrā, kas nepārsniedz 35 °C. Atlikumu atšķaida ar fosfātu buferšķīdumu (4.5.) tā, lai cinka bacitracīna saturs būtu 0,42 IV/ml (= u_8).

6.2. *Pārbaudes šķīdumi*

No šķīduma u_8 pagatavo šķīdumus u_4 (aptuvenā koncentrācija: 0,21 IV/ml), u_2 (aptuvenā koncentrācija: 0,105 IV/ml), un u_1 (aptuvenā koncentrācija: 0,0525 IV/ml), tos pakāpeniski atšķaidot (1 + 1) ar fosfātu buferšķīdumu (4.5.).

7. **Pārbaudes procedūra**

7.1. *Pārbaudes vides apsēšana*

Pārbaudes vidi (4.2.) apsēj ar baktēriju suspensiju apmēram 50 °C temperatūrā. Iepriekšējos izmēģinājumos uz plātnēm ar pārbaudes vidi (4.2.) nosaka baktēriju suspensijas daudzumu, kas nodrošina lielāko un skaidrāko kavēšanas zonu veidošanos ar dažādām cinka bacitracīna koncentrācijām.

7.2. *Plātņu sagatavošana*

Difūziju caur agaru izdara uz plātnēm ar četru dažādu koncentrāciju standartšķīdumiem (s_8, s_4, s_2 un s_1) un četru koncentrāciju pārbaudes šķīdumiem (u_8, u_4, u_2 un u_1). Šīm četrām dažādām ekstrakta šķīdumu un standartšķīdumu koncentrācijām noteikti jābūt uz katras plātnes. Šajā nolūkā izvēlas pietiekami lielas plātnes, uz kurām agara barotnē var izveidot vismaz astoņus iedobumus 10-13 mm diametrā, kuru centri ir attālināti vismaz par 30 mm. Testu var veikt uz plātnes, kas izveidota no stikla loksnes, uz kuras uzlikts 20 mm augsts anodēta alumīnija vai plastmasas riņķis ar 200 mm diametru.

Plātnēs salej tādu daudzumu barotnes (4.2.), kas apsēta saskaņā ar 7.1. punktu, lai iegūtu apmēram 2 mm biezu slāni (60 ml uz plātni ar 200 mm diametru). Atstāj sastingt horizontālā stāvoklī, izveido iedobumus un tajos precīzi izmērītā daudzumā iepilda noteikšanas šķīdumus un standartšķīdumus (no 0,10 līdz 0,15 ml vienā iedobumā atkarībā no diametra). Katru koncentrāciju pārbauda vismaz četras reizes, un tādējādi katrā noteikšanā jānovērtē vismaz 32 kavēšanas zonas.

7.3. *Inkubēšana*

Plātnes inkubē 16 līdz stundas 30 ± 2 °C temperatūrā.

8. **Novērtēšana**

Ar precizitāti līdz 0,1 mm izmēra kavēšanas zonu diametru. Uz puslogaritmiskā papīra atzīmē punktus, kas atbilst kavēšanas zonu vidējam diametram atkarībā no koncentrācijas. Uzzīmē "atbilstošākās" līknes attiecīgi standartšķīdumam un ekstraktam, piemēram, šādi:

aprēķina "atbilstošāko" punktu standarta zemākajam līmenim (SL) pēc formulas:

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

aprēķina "atbilstošāko" punktu standarta augstākajam līmenim (SH) pēc formulas:

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

Līdzīgi aprēķina "atbilstošākos" punktus ekstrakta zemākajam koncentrācijas līmenim (UL) un augstākajam līmenim (UH), norādītajās formulās s_1, s_2, s_4 un s_8 aizstājot attiecīgi ar u_1, u_2, u_4 un u_8.

Tajā pašā grafikā atzīmē SL un SH vērtības, un tās savieno, iegūstot "atbilstošāko" līniju standartšķīdumam. Līdzīgi atzīmē UL un UH, ko savieno, iegūstot "atbilstošāko" līniju ekstraktam.

Ja nav nekādu traucējošu faktoru, abām līnijām vajadzētu būt paralēlām. Praktisku apsvērumu dēļ līnijas var uzskatīt par paralēlām, ja (SH-SL) un (UH-UL) neatšķiras vairāk par 10 % no to vidējā lieluma.

Konstatējot, ka līnijas nav paralēlas, var atmest u_1 un s_1 vai u_8 un s_8, un SL, SH, UL un UH "piemērotākās" līknes aprēķināt pēc alternatīvām formulām:

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

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

un līdzīgi aprēķina UL un UH. Jāievēro tie paši paralelitātes kritēriji. Ja rezultāti aprēķināti pēc trim līmeņiem, to norāda gala ziņojumā.

Ja līnijas uzskata par paralēlām, atkarībā no tā, vai paralelitāte novērtēta pēc trīs vai četriem līmeņiem, aprēķina relatīvās aktivitātes logaritmu (log A), izmantojot kādu no šādām formulām.

Pēc četriem līmeņiem:

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

pēc trim līmeņiem:

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

vai

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

Parauga ekstrakta aktivitāte = attiecīgā standartšķīduma aktivitāte × A

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

Ja relatīvā aktivitāte ir zemāka par 0,5 vai augstāka par 2,0, pārbaudi izdara atkārtoti, attiecīgi koriģējot ekstrakta koncentrācijas, vai, ja tas nav iespējams, koriģējot standartšķīdumu koncentrācijas. Ja nevar panākt, ka relatīvā aktivitāte ir vajadzīgajās robežās, iegūtais rezultāts uzskatāms par aptuvenu, un tas būtu jānorāda gala ziņojumā.

Ja nevar uzskatīt, ka līnijas ir paralēlas, noteikšanu izdara atkārtoti. Ja nevar panākt paralelitāti, noteikšana jāuzskata par neapmierinošu.

Rezultātu izsaka miligramos cinka bacitracīna uz barības kilogramu.

9. **Atkārtojamība**

No viena parauga viena operatora divās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirība nedrīkst pārsniegt:

— 2 mg/kg pēc absolūtā lieluma, ja cinka bacitracīna saturs nepārsniedz 10 mg/kg,

— 20 % no augstākā lieluma, ja cinka bacitracīna saturs ir no 10 līdz 25 mg/kg,

— 5 mg/kg pēc absolūtā lieluma, ja cinka bacitracīna saturs ir no 25 līdz 50 mg/kg,

— 10 % no augstākā lieluma, ja cinka bacitracīna saturs pārsniedz 50 mg/kg.

([1]) 1 mg barības kvalitātes cinka bacitracīna ir ekvivalents 42 internacionālajām vienībām (IV)
([a]) Var izmantot citas metodes ar nosacījumu, ka ir pierādīts, ka tās dod līdzīgas baktēriju suspensijas.
([b]) Var izmantot līdzīga sastāva gatavas nopērkamas barotnes, ar kurām iegūst tādus pašus rezultātus."