31984L0004

18.1.1984 *IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ* L 15/28

ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI
ta' l-20 ta' Diċembru 1983
li temenda d-Direttivi 71/393/KEE, 72/199/KEE u 78/633/KEE li tistabbilixxi metodi Komunitarji ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf

(84/4/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jistabilixxi l-Komunità Ekonomika Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni tal-metodi Komunitarji ta' teħid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' affarijiet ta' l-għalf [1], kif l-aħħar emendata bl-Att ta' l-Adeżjoni tal-Greċja, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tagħha,

Billi d-Direttivi tal-Kummissjoni 71/393/KEE [2], 72/199/KEE [3] u 78/633/KEE [4] stabbilew il-metodi ta' analiżi għal żjut u xaħmijiet krudi, *virginiamycin* u żingu *bacitracin*; billi hemm bżonn li dawn il-metodi jiġu sostitwiti b'metodi li jirriflettu avvanzi f'tagħrif xjentifiku u tekniku;

Billi l-miżuri previsti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti għall-Għalf,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

L-Artikolu 1

Fl-Anness mad-Direttiva 71/393/KEE, il-parti IV "Id-Determinazzjoni ta' żjut u xaħmijiet krudi" hija sostitwita bl-Anness I ma' din id-Direttiva.

L-Artikolu 2

Fl-Anness II mad-Direttiva 72/199/KEE, il-parti 5 "Id-Determinazzjoni ta' *virginiamycin* b' diffużjoni f'medium ta' l-agar" hija sostitwita bl-Anness II ma' din id-Direttiva.

L-Artikolu 3

Fl-Anness mad-Direttiva 78/633/KEE, il-parti 1 "Id-Determinazzjoni ta' żingu *bacitracin* b' diffużjoni f' *medium* ta' l-agar" hija sostitwita bl-Anness III ma' din id-Direttiva.

L-Artikolu 4

L-Istati Membri għandhom, sa mhux iktar tard mill-1 ta' Ġunju 1984, iġibu fis-seħħ il-liġijiet, ir-regolamenti jew id-dispożizzjonijiet amministrattivi neċessarji biex jikkonformaw ma' din id-Direttiva u għandhom minnufih jinfurmaw lill-Kummissjoni bihom.

l-Artikolu 5

Din id-Direttiva għandha lill-Istati Membri bħala d-destinatarji tagħha.

Magħmula fi Brussel, fl-20 ta' Diċembru 1983.

Għall-Kummissjoni

Poul DALSAGER

Membru tal-Kummissjoni

---

(1) ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.
(2) ĠU L 279, ta' l-20.12.1971, p. 7.
(3) ĠU L 123, tad-29.5.1972, p. 6.
(4) ĠU L 206, tad-29.7.1978, p. 43.

L-ANNESS I

"4. **ID-DETERMINAZZJONI TA' ŻJUT U XAĦMIJIET KRUDI**

1. **L-iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut ta' żjut u xaħmijiet krudi fl-għalf. Ma jkoprix l-analiżi taż-żerriegħa taż-żejt u tal-frott oleaġinuż fir-Regolament tal-Kunsill 136/66/KEE tat-22 ta' Settembru 1966.

Jiddependi fuq in-natura ta' l-għalf, kwalunkwe wieħed mill-metodi deskritti għandhom jintużaw.

1.1. *Il-metodu A*

Applikabbli għal għalf mingħajr addittivi ta' oriġini mill-pjanti, ħlief għal dawk li huma magħrufa li jikkontjenu żjut u xaħmijiet li ma jistgħux jiġu kompletament estratti b'*petroleum* ħafif mingħajr idrolisi minn qabel. Fost dawn huma l-gluteni, il-ħmira, s-soja u l-proteini tal-patata. Dan il-metodu huwa wkoll applikabli għal għalf kompost, ħlief għal dak li jikkontjeni trab tal-ħalib jew li minnu żjut u xaħmijiet ma jistgħux jiġu estratti kompletament b'*petroleum* ħafif mingħajr idroliżi minn qabel.

1.2. *Il-metodu B*

Applikabbli għal għalf mingħajr addittivi ta' oriġini mill-annimali kif ukoll għal għalf imsemmi taħt il-punt 1.1 bħala eċċezzjonijiet għall-metodu A.

2. **Il-prinċipju**

2.1. *Il-metodu A*

Il-kampjun huwa estratt b'petroleum ħafif. Is-solvent huwa ddistillat u r-residwu mnixxef u ppeżat.

2.2. *Il-metodu B*

Il-kampjun huwa ttrattat taħt sħana b'aċidu idrokloriku. It-taħlita hija mkessħa u ffiltrata. Ir-residwu hu maħsul u mnixxef u sottomess għad-determinazzjoni skond il-metodu A.

3. **Ir-riaġenti**

3.1. *Petroleum* ħafif, firxa tat-togħlija: 40 sa 60 °C. Il-valur tal-bromu għandu jkun inqas minn1 u r-residwu ta' l-evaporazzjoni inqas minn 2 mg/100 ml.

3.2. Is-sulfat tas-sodju, anidridu.

3.3. Aċidu idrokloriku 3N.

3.4. Għajnuna għall-filtrazzjoni, eż. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **L-apparat**

4.1. Apparat ta' estrazzjoni. Jekk bis-*siphon* (L-apparat Soxhlet), ir-rata *reflux* għandha tkun tali li tipproduċi madwar 10 ċikli fis-siegħa; jekk tat-tip *non-siphoning*, ir-rata *reflux* għandha tkun madwar 10 ml fil-minuta.

4.2. Ħoloq ta' estrazzjoni, ħielsa minn materja solubili f'petroleum ħafif u li jkollhom porosità konsistenti mal-ħtiġiet tal-punt 4.1.

4.3. Forn ta' tnixxif, jew forn vakwu stabbilit f'75 ± 3 °C jew forn ta' l-arja stabbilit f'100 ± 3 °C.

5. **Il-proċedura**

5.1. *Il-metodu A* (ara l-punt 8.1)

Iżen 5 g tal-kampjun sa l-eqreb 1 mg, ittrasferixxi għal ħolqa ta' estrazzjoni (4.2) u kopri b'biċċa tajjara ħielsa mix-xaħam.

Qiegħed il-ħolqa f'estrattur (4.1) u agħmel estrazzjoni għal sitt sigħat b'*petroleum* ħafif (3.1). Iġbor l-estratt tal-*petroleum* ħafif fi fjasketta niexfa, peżata li tikkontjeni frak ta' ġebla ħaffiefa [1]

Iddistilla s-solvent. Nixxef ir-residwu ta' l-evaporazzjoni u żomm il-fjasketta għal siegħa u nofs fil-forn tat-tnixxif (4.3). Ħallih jiksaħ f'dessikatur u iżen. Erġa' nixxef għal 30 minuta sabiex tassigura li l-piż taż-żjut u x-xaħmijiet jibqgħu kostanti (telf fil-piż bejn żewġ piżijiet suċċessivi għandu jkun inqas minn 1 mg).

5.2. *Il-metodu B*

Iżen 2,5 g tal-kampjun sa l-eqreb 1 mg (ara l-punt 8.2), qiegħed f' beaker ta' 400 ml jew fjasketta konika ta' 300 ml u żid 100 ml aċidu idrokloriku 3N (3.3) u frak ta' ġebla ħaffiefa. Kopri l-*beaker* b'*watch glass* jew mal-fjasketta konika waħħal *reflux condenser*. Għalli t-taħlita bil-mod fuq fjamma baxxa jew *hot plate* u żommha hekk għal siegħa. Tħallix il-prodott jeħel mal-ġnub tal-kontenitur.

Kessaħ u żid kwantità ta' assistenza ta' filtrazzjoni (3.4) biżżejjed biex tipprevieni xi telf ta' żejt u xaħam tul il-filtrazzjoni. Iffiltra minn karta filtru doppja, niedja, ħielsa mix-xaħam. Aħsel ir-residwu f'ilma kiesaħ sakemm jinkiseb filtrat newtrali. Ikkontrolla li l-filtrat ma jikkontjenix xi żejt jew xaħam. Il-preżenza tagħhom tindika li l-kampjun għandu jiġi estratt b'*petroleum* ħafif, bl-użu tal-metodu A, qabel l-idroliżi.

Qiegħed il-karta filtru doppja li tikkontjeni r-residwu fuq *watch glass* u nixxef għal siegħa u nofs fil-forn f'100 ± 3 °C.

Qiegħed il-karta tal-filtru doppja li tikkontjnei r-residwu niexef f'ħolqa ta' estrazzjoni (4.2) u kopri b'biċċa tajjara ħielsa mix-xaħam. Qiegħed il-ħolqa f'estrattur (4.1) u pproċedi kif indikat fit-tieni u t-tielet paragrafu tal-punt 5.1.

6. **L-espressjoni tar-riżultati**

Esprimi l-piż tar-residwu bħala perċentwali tal-kampjun.

7. **Ir-rata ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli imwettqa fuq l-istess kampjun, mill-istess analist, m'għandhiex taqbeż:

— 0,2 %, f'valur assolut, għal kontenuti ta' żjut u xaħmijiet krudi inqas minn 5 %,

— 4,0 % relata ma' l-ogħla valur għal kontenuti ta' 5 sa 10 %,

— 0,4 % f'valur assolut, għal kontenuti'l fuq minn 10 %.

8. **Osservazzjonijiet**

8.1. Għal prodotti b'kontenut għoli ta' żjut u xaħmijiet u li huma diffiċli biex tagħsar jew mhux xierqa biex jittieħed minnhom kampjun tat-test omoġenju u mnaqqas, ipproċedi kif ġej.

Iżen 20 g tal-kampjun sa l-eqreb 1 mg u ħallat b' 10 g jew iktar tas-sulfat tas-sodju anidridu (3.2). Agħmel estrazzjoni b' *petroleum* ħafif (3.1) kif indikat fil-punt 5.1. Żid l-estratt ottenut għal 500 ml b'*petroleum* ħafif (3.5) u omoġenizza. Ħu 50 ml tas-soluzzjoni u qiegħed fi fjasketta żgħira, niexfa, peżata li tikkontjeni biċċiet ta' ġebla ħaffiefa [1]. Iddistilla s-solvent, nixxef u pproċedi kif indikat fl-aħħar paragrafu tal-punt 5.1.

Elimina s-solvent mir-residwu ta' l-estrazzjoni li baqa' fil-ħolqa u agħsar ir-residwu għal irquqija ta' 1 mm. Raġġa' lura l-prodott għall-ħolqa ta' estrazzjoni (iżżidx is-sulfat tas-sodju), u pproċedi kif indikat fit-tieni u t-tielet paragrafu ta' 5.1

Ikkalkula l-kontenut ta' żjut u xaħmijiet bħala perċentwali tal-kampjun bl-użu tal-formola li ġejja:

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

fejn:

a = massa fi grammi tar-residwu wara l-ewwel estrazzjoni (parti alikwot ta' l-estratt),

b = massa fi grammi tar-residwu wara t-tieni estrazzjoni.

8.2. Għal prodotti baxxi fi żjut u xaħmijiet il-kampjun tat-test jista' jiżdied sa 5 g.

[1] Meta ż-żejt jew ix-xaħam għandu jgħaddi testijiet sussegwenti ta' kwalità, issostitwixxi l-biċċiet tal-ġebla ħaffiefa b'żibeġ tal-ħġieġ."

L-ANNESS II

"5. **Id-determinazzjoni ta' *virginiamycin***

— b'diffużjoni f'medium ta' l-agar —

1. **L-iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni**

Il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' virginiamycin fl-affarijiet ta' l-ikel għall-annimali u f'taħlitiet minn qabel. Il-limitu ta' determinazzjoni l-iktar baxx huwa 2 mg/kg (2 ppm) [1].

2. **Il-prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt b'soluzzjoni metanolika ta' Tween 80. L-estratt huwa mferra' jew ċentrifugat u ddilwit. L-attività antibijotika tagħha hija determinata bil-kejl tad-diffużjoni ta' virginiamycin f'*medium* ta' l-agarinokulat bil-Micrococcus luteus. It-tixrid jintwera permezz tal-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni tal-mikro-organiżmu. Id-djametru ta' dawn iż-żoni għandu jiġi meqjus bi proporzjon dirett għall-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika tul il-firxa tal-konċentrazzjonijiet antibijotiċi impjegati.

3. **Mikro-organiżmu: Micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1. *Iż-żamma tal-kultura stock*

Laqqam it-tubi li jikkontjenu inklinazzjonijiet tal-medium tal-kultura (4.1) bil-Micrococcus luteus u inkubahom għal 24 siegħa fi 30 °C. Aħżen il-kultura fi friġġ f'madwar 4 °C. Erġa' laqqam kull ġimagħtejn.

3.2. *Il-preparazzjoni tas-sospensjoni tal-batterji* [a]

Aħsad it-tkabbir minn inklinazzjoni ta' l-agar ippreparata riċentement (3.1) b'2 sa 3 ml tas-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) Uża din is-sospensjoni sabiex tlaqqam 250 ml tal-*medium* tal-kultura (4.1) kontenut fi fjasketta Roux u inkuba għal 18 sa 20 siegħa fi 30 °C. Aħsad it-tkabbir f' 25 ml tas-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) u ħallat. Iddilwixxi s-sospensjoni għal 1/10 bis-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3). It-trasmissjoni ħafifa tas-sospensjoni għandha tkun madwar 75 %, imkejla f'650 nm f' ċellola ta' 1 ċm kontra s-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) Din is-soluzzjoni tista' tinżamm għal ġimgħa f'madwar 4 °C.

4. **Medja ta' kultura u riaġenti**

4.1. *Culture* u *assay medium* [b]

Peptone tal-laħam	6,0 g
Trittonju	4,0 g
Estratt tal-ħmira	3,0 g
Estratt tal-laħam	1,5 g
Glukosju	1,0 g
Agar	10,0 sa 20,0 g
Ilma	1 000 ml

ph 6,5 (wara l-isterilizzazzjoni).

4.2. *Newtralizzant tal-fosfat, pH 6*

Fosfat ta' l-idroġenu tal-potassju, K_2HPO_4	2,0 g
Fosfat tad-didroġenu tal-potassju, KH_2PO_4	8,0 g
Ilma sa	1 000 ml

4.3. Soluzzjoni tal-klorur tas-sodju 0,8 % (w/v): ħoll 8 g tal-klorur tas-sodju fl-ilma u ddilwixxi sa 1 000 ml; sterilizza.

4.4. Il-metanol.

4.5. Taħlita tan-newtralizzant tal-fosfat (4.2)/il-metanol (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Soluzzjoni metanolika Tween 80 0,5 % (w/v): ħoll 5 g Tween 80 fil-metanol (4.4) u ddilwixxi bil-metanol sa 1 000 ml.

4.7. Is-sustanza standard: virginiamycin ta' attività magħrufa.

5. **Soluzzjonijiet standard**

Ħoll kwantità peżata b'mod eżatt tas-sustanza standard (4.8) fil-metanol (4.4) u ddilwixxi bil-metanol (4.4) biex tagħti soluzzjoni *stock* litikkontjeni 1 000 µg virginiamycin għal kull ml.

Maħżuna fi fjasketta magħluqa f'4 °C, din is-soluzzjoni hi stabbli għal sa ħamest ijiem.

Minn din is-soluzzjoni *stock* ipprepara b'dilwizzjoni suċċessiva bit-taħlita (4.5) s-soluzzjonijiet li ġejjin:

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

6. **Preparazzjoni ta' l-estratt u soluzzjonijiet *assay***

6.1. *L-estrazzjoni*

6.1.1. Prodotti b'kontenut ta' virginiamycin sa 100 mg/kg

Iżen kwantità tal-kampjun ta' 50 g, żid 200 ml tas-soluzzjoni (4.6) u ħawwad għal 30 minuta. Ħallih joqgħod u jiċċentrifuga, ħu 20 ml tas-soluzzjoni supernatanti u evapora sa madwar 5 ml f'evaporatur *rotary* f'temperatura li ma teċċedix 40 °C. Iddilwixxi r-residwu bit-taħlita (4.5) sabiex tottjeni kontenut ta' *virginiamycin* ta' 1 mg/ml (= u_8).

6.1.2. Prodotti b' kontenut ta' *virginiamycin* ikbar minn 100 mg/kg

Iżen kwantità tal-kampjun li ma teċċedix 10,0 g u li tikkontjeni bejn 1 u 50 mg *virginiamycin*, żid 100 ml tas-soluzzjoni (4.6) u ħawwad għal 30 minuta. Ħalliha toqgħod jew tiċċentrifuga, imbagħad iddiluwixxi s-soluzzjoni supernatanti bit-taħlita (4.5) biex tottjeni kontenut mistenni tal-*virginiamycin* ta' 1 mg g/ml (= u_8).

6.2. *Soluzzjonijiet assay*

Mis-soluzzjoni u_8 ipprepara soluzzjonijiet u_4 (kontenut mistenni: 0,5 m g/ml), u_2 (kontenut mistenni: 0,25 mg/ml) u_1 (kontenut mistenni: 0,125 mg/ml) permezz ta' dilwizzjoni suċċessiva (1 + 1) mat-taħlita (4.5).

7. **Proċedura assay**

7.1. *Inokulazzjoni ta' l-assay medium*

Laqqam l-*assay medium* (4.1) bis-sospensjoni tal-batterja (3.2) f'madwar 50 °C. Bi provi preliminari fuq pjanċi medium (4.1) iddetermina l-kwantità tas-sospensjoni tal-batterja meħtieġa biex tagħti l-akbar żoni u dawk l-iktar ċari ta' inibizzjoni mal-konċentrazzjonijiet varji ta' *virginiamycin*.

7.2. *Il-preparazzjoni tal-pjanċi*

Id-diffużjoni permezz ta' l-agar hija mwettqa fi pjanċi bl-erba' konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (s_8, s_4, s_2 u s_1) u l-erba' konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni *assay* (u_8, u_4, u_2 u u_1). Dawn l-erba' konċentrazzjonijiet ta' estratt u standard għandhom neċessarjament jitqiegħdu f'kull pjanċa. Għal dan l-iskop, agħżel pjanċi kbar biżżejjed biex jippermettu mill-inqas tmien toqbiet b'dijametru ta' 10 sa 13-il mm u mhux inqas minn 30 mm bejn iċ-ċentri li għandhom isiru fil-*medium* ta' l-agar. It-test jista' jitwettaq fuq pjanċi li jikkonsistu f'folja tal-ħġieġ b'ċirku ta' superfiċi ta' l-aluminju jew tal-plastik imqiegħed fuq, 200 mm fid-dijametru u 20 mm għoli.

Ferragħ fil-pjanċi kwantità tal-medium (4.1), imlaqqam bħal f'7.1, biex tagħti saff madwar 2 mm oħxon (60 ml għal pjanċa ta' 200 mm djametru). Ħalliha toqgħod f'pożizzjoni livell, taqqab it-toqob u qiegħed fihom volumi mkejla eżatt ta' soluzzjonijiet ta' analiżi u standard (bejn 0,10 u 0,15 ml għal kull toqba, skond id-djametru). Applika kull konċentrazzjoni mill-inqas erba' darbiet sabiex kull determinazzjoni hi soġġetta għal evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

7.3. *L-inkubazzjoni*

Inkuba l-pjanċi għal 16 sa 18-il siegħa f' 30 ± °C.

8. **L-evalwazzjoni**

Kejjel id-djametru taż-żoni ta' inibizzjoni sa l-eqreb 0,1 mm. Irreġistra l-kejl medju għal kull konċentrazzjoni fuq karta grafika semilogaritimika li turi l-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet f'relazzjoni mad-dijametri taż-żoni ta' inibizzjoni. Pinġi l-linji ta' l-aħjar qagħda kemm tas-soluzzjoni standard u kemm ta' l-estratt, per eżempju bħal taħt.

Iddetermina l-punt ta 'l-aħjar qagħda' għal-livell standard l-iktar baxx (SL) bl-użu tal-formula:

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

Iddetermina l-punt ta' 'l-aħjar qagħda' għall-livell standard l-iktar għoli (SH) bl-użu tal-formula:

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

Bl-istess mod, ikkalkula l-punti ta' 'l-aħjar qagħda' għal-livell ta' l-estratt l-iktar baxx (UL) u l-livell l-iktar għoli ta' l-estratt (UH) billi tissostitwixxi U_1, U_2, U_4 uU_8 għal S_1, S_2, S_4 u S_8 fil-formuli ta' hawn fuq.

Irreġistra l-valuri kkalkolati SL u SH fuq l-istess karta grafika u għaqqadhom biex tagħti l-linja ta' 'l-aħjar qagħda' għas-soluzzjoni standard. Bl-istess mod, irreġistra UL u UH u għaqaqdhom biex tagħti l-linja ta' 'l-aħjar qagħda' għall-estratt.

Fl-assenza ta' xi interferenza l-linji għandhom ikunu paralleli. Għal skopijiet prattiċi l-linji jistgħu jiġu kkunsidrati paralleli jekk il-valuri (SH-SL) u (UH-UL) ma jvarjawx b'iktar minn 10 % mill-valur medju tagħhom.

Jekk il-linji jinstab li mhumiex paralleli, jew l-U_1 u s-S_1 jew l-U_8 u s-S_8 jistgħu jitwarrbu u s-SL, s-SH, l-UL u l-UH ikkalkulati, bl-użu tal-formuli alternattivi, biex jagħtu l-linji alternattivi ta' 'l-aħjar qagħda':

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

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

u bl-istess mod għal UL u UH. L-istess kriterju ta' paralelliżmu għandu jiġi ssodisfat. Il-fatt li r-riżultat ġie kkalkolat minn tliet livelli għandu jiġi nnutat fir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bħala paralleli, ikkalkula l-logaritmu ta' l-attività relattiva (log A) permezz ta' waħda mill-formuli li ġejjin, jiddependi fuq jekk tlieta jew erba' livelli intużawx għall-istima tal-paralelliżmu.

Għal erba' livelli

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

Għal tliet livelli

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

jew

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

Attività ta' l-estratt kampjun = attività ta' l-istandard relevanti × A

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

Jekk l-attività relattiva tinsab barra l-firxa ta' 0,5 sa 2,0, imbagħad irrepeti l-assay bl-aġġustamenti approprjati għall-konċentrazzjonijiet ta' l-estratt jew, jekk dan mhuwiex possibbli, għas-soluzzjonijiet standard. Meta l-attività relattiva ma tistax tinġieb fil-firxa meħtieġa, kull riżultat ottenut għandu jiġi kkunsidrat bħala bejn wieħed u ieħor u dan għandu jiġi nnutat fuq ir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bħala mhux paralleli, irrepeti d-determinazzjoni. Jekk il-paralelliżmu xorta ma jintlaħaqx, id-determinazzjoni għandha tiġi kkunsidrata bħala mhux sodisfaċenti.

Esprimi r-riżultat f'milligrammi ta' virginiamycin għal kull kilogramma ta' għalf.

9. **Ir-rata ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun mill-istess analist m' għandhiex taqbeż:

— 2 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' *virginiamycin* sa 10 mg/kg,

— 20 % relata ma' l-ogħla valur għal kontenuti ta' 10 sa 25 mg/kg,

— 5 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' 25 sa 50 mg/kg,

— 10 % relatat ma' l-ogħla valur għal kontenuti l fuq minn 50 mg/kg.

([1]) 1 mg *virginiamycin* hija ekwivalenti għal 1 000 unità UK.
([a]) Jistgħu jintużaw metodi oħrajn sakemm ikun ġie stabbilit li jagħtu sospensjonijiet batterjali simili.
([b]) Kull *medium* tal-kultura kummerċjali ta' kompożizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati jista' jiġi użat."

L-ANNESS III

"**1. ID-DETERMINAZZJONI TA' *BACITRACIN* TAŻ-ŻINGU**

– b'diffużjoni f'medium ta' l-agar -

1. **L-iskop u l-qasam ta' applikazzjoni**

Il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' bacitracin taż-żingu f'għalf u f'taħlitiet minn qabel. Il-limitu ta' determinazzjoni'l iktar baxx huwa 5 mg/kg (5 ppm) ([1]).

2. **Il-prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt b'pH 2 b'taħlita ta' metanol/ilma/aċidu idrokloriku, u soluzzjoni tas-sulfide tas-sodju. L-addizzjoni tas-sulfide tas-sodju hija biex tippreċipita xi minerali solubili tar-ramm li jistgħu jinterefrixxu ma' l-*assay*. L-estratt jinġjieb għall-pH 6,5, konċentrat (meta neċessarju) u dilwit. L-attività antibijotika tagħha hija determinata bil-kejl tad-diffużjoni ta' bacitracin taż-żingu f'*medium* ta' l-agar imlaqqam bil-Micrococcus luteus (flavus). It-tixrid jintwera permezz tal-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni tal-mikro-organiżmu. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni għandu jiġi meqjus bi proporzjon dirett għal-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika tul il-firxa tal-konċentrazzjonijiet antibijotiċi impjegati.

3. **Il-mikro-organiżmu: Micrococcus luteus (flavus) ATCC 10240**

3.1. *Iż-żamma tal-kultura stock*

Laqqam it-tubi li jikkontjenu inklinazzjonijiet tal-medium tal-kultura (4.1) bil-Micrococcus luteus u inkubahom għal 24 siegħa fi 30 °C. Aħżen il-kultura fi friġġ f'madwar 4 °C. Erġa' laqqam kull ġimagħtejn

3.2. *Il-preparazzjoni tas-sospensjoni tal-batterja* ([a])

Aħsad it-tkabbir minn inklinazzjoni ta' l-agar ippreparata riċentement (3.1) b'2 sa 3 ml tas-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) Uża din is-sospensjoni sabiex tlaqqam 250ml tal-medium tal-kultura (4.1) kontenut fi fjasketta Roux u inkuba għal 18 sa 20 siegħa fi 30 °C. Aħsad it-tkabbir f'25ml tas-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) u ħallat. Iddilwixxi s-sospensjoni għal 1/10 bis-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) It-trasmissjoni ħafifa tas-sospensjoni għandha tkun madwar 75 %, imkejla f'650 nm f'ċellola ta' 1 ċm kontra s-soluzzjoni tal-klorur tas-sodju (4.3) Din is-soluzzjoni tista' tinżamm għal ġimgħa f'madwar 4 °C.

4. **Medja ta' kultura u riaġenti**

4.1. *Il-medium* tal-kultura ([b])

Peptone tal-laħam	6,0 g
Trittonjnu	4,0 g
Estratt tal-ħmira	3,0 g
Estratt tal-laħam	1,5 g
Glukosju	1,0 g
Agar	10,0 sa 20,0 g
Ilma	1 000 ml

pH 6,5 sa 6,6 (wara l-isterilizzazzjoni)

4.2. *L-assay medium* ([b])

Trittonu	10,0 g
Estratt tal-ħmira	3,0 g
Estratt tal-laħam	1,5 g
Glukosju	1,0 g
Agar	10,0 sa 20,0 g
Tween 80	1 ml
Ilma	1 000 ml

pH 6,5 (wara l-isterilizzazzjoni).

4.3. Soluzzjoni tal-klorur tas-sodju 0,8 % (w/v): ħoll 8 g tal-klorur tas-sodju fl-ilma u ddilwixxi sa 1 000 ml; sterilizza.

4.4. Taħlita ta' metanol/ilma/aċidu idrokloriku (4.6):

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

4.5. *Newtralizzant tal-fosfat, pH 6,5:*

Fosfat ta' l-idroġenu tal-potassju K_2HPO_4	22,15 g.
Fosfat tad-didroġenu tal-potassju KH_2PO_4	27,85 g.
Ilma sa	1 000 ml.

4.6. Aċidu idrokloriku (d: 1,18 sa 1,19).

4.7. Aċidu idrokloriku (0,1 M).

4.8. Idrossidu tas-sodju 1 M soluzzjoni.

4.9. Sulfide tas-sodju madwar 0,5 M soluzzjoni.

4.10. Soluzzjoni vjola tal-*Bromocresol* 0,04 % (w/v): ħoll 0,1 g tal-*bromocresol* vjola f'18,5 ml ta' 0,01 M soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju. Żid il-volum sa 250 ml bl-ilma u ħallat.

4.11. Sustanza standard: *bacitracin* taż-żingu ta' attività magħrufa (in i. u.).

5. **Soluzzjonijiet standard**

Iżen kwantità ta' *bacitracin* standard taż-żingu (4.11) li tikkorrispondi għal 1 050 i.u. (skond l-attività indikata). Żid 5 ml ta' 0,1 M aċidu idrokloriku (4.7) u ħallih joqgħod għal 15-il minuta. Żid 30 ml ilma, aġġusta l-pH għal 4,5 bin-newtralizzant tal-fosfat (4.5) (madwar 4 ml), żid sa volum ta' 50 ml bl-ilma u ħawwad sewwa (1 ml = 21 i.u.).

Minn din is-soluzzjoni prinċipali ipprepara b'dilwizzjoni suċċessiva b'newtralizzant tal-fosfat (4.5) is-soluzzjonijiet li ġejjin:

s_8	0,42	i.u./ml
s_4	0,21	i.u./ml
s_2	0,105	i.u./ml
s_1	0,0525	i.u./ml

6. **Preparazzjoni ta' l-estratt u soluzzjonijiet *assay***

6.1. *L-estrazzjoni*

6.1.1. **Taħlitiet minn qabel u għalf minerali**

Iżen kwantità ta' kampjun ta' 2,0 sa 5,0 g, żid 29,0 ml tat-taħlita (4.4) u 1,0 ml tas-soluzzjoni tas-sulfide tas-sodju (4.9) u ħawwad ftit. Ikkontrolla li l-pH hija madwar 2. Ħawwad għal 10 minuti, żid 30ml tan-newtralizzant tal-fosfat (4.5), ħawwad għal 15-il minuta u ċentrifuga. Ħu alikwot adattat tas-soluzzjoni supernatanti u aġġusta l-pH sa 6,5 permezz tas-soluzzjoni ta' l-idrossidu ta' 1M (4.8) b'metru tal-pH jew bis-soluzzjoni vjola tal-*bromocresol* (4.10) bħala indikatur. Iddilwixxi bin-newtralizzant tal-fosfat (4.5) biex tottjeni kontenut mistenni tal-*bacitracin* taż-żingu ta' 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.2. **Konċentrati tal-proteina**

Iżen kwantità ta' kampjun ta' 10,0 g, żid 49,0 ml tat-taħlita (4.4) u 1,0 ml tas-soluzzjoni tas-sulfide tas-sodju (4.9) u ħawwad ftit. Ikkontrolla li l-pH hija madwar 2. Ħawwad għal 10 minuti. Żid 5 ml tan-newtralizzant tal-fosfat (4.5), ħawwad għal 15-il minuta u ċentrifuga. Ħu volum adattat tas-soluzzjoni supernatanti u aġġusta l-pH sa 6,5 permezz tas-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju 1M (4.8) b'metru tal-pH jew bis-soluzzjoni vjola tal-*bromocresol* (4.10) bħala indikatur. Evapora sa bejn wieħed u ieħor nofs il-volum f'evaporatur *rotary* f' temperatura li ma taqbiżx il– 35 °C.

Iddilwixxi bin-newtralizzant tal-fosfat (4.5) biex tottjeni kontenut mistenni tal-*bacitracin* taż-żingu ta' 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.3. **Għalf ieħor**

Iżen kwantità ta' kampjun ta' 10,0 g (20,0 g għal kontenut mistenni tal-bacitracin taż-żingu ta' 5 mg/kg). Żid taħlita ta' 24,0 ml mit-taħlita (4.4) u 1,0 ml tas-soluzzjoni tas-sulfide tas-sodju (4.9) u omoġenizza għal 10 minuti. Żid 5 ml tan-newtralizzant tal-fosfat (4.5), ħawwad għal 15-il minuta u ċentrifuga. Ħu 20ml tas-soluzzjoni supernatanti u aġġusta l-pH sa 6,5 permezz tas-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju 1M (4.8) b'metru tal-pH jew bis-soluzzjoni vjola tal-bromocresol (4.10) bħala indikatur. Evapora sa madwar 4 ml f'evaporatur *rotary* f'temperatura li ma teċċedix 35 °C. Iddilwixxi r-residwu bin-newtralizzant tal-fosfat (4.5) sabiex tottjeni kontenut mistenni tal-bacitracin taż-żingu ta' 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.2. *Soluzzjonijiet assay*

Mis-soluzzjoni u_8 ipprepara soluzzjonijiet u_4 (kontenut mistenni: 0,21 i.u./ml), u_2 (kontenut mistenni: 0,105 i.u./ml) u u_1 (kontenut mistenni:/ml) permezz ta' dilwizzjoni suċċessiva (1 + 1) b'newtralizzant tal-fosfat (4.5).

7. **Proċedura *assay***

7.1. *Inokulazzjoni ta' l assay medium*

Laqqam l-*assay medium* (4.1) bis-sospensjoni tal-batterja (3.2) f'madwar 50 °C. Bi provi preliminari fuq pjanċi bl-assay medium (4.1) iddetermina l-kwantità tas-sospensjoni tal-batterja meħtieġa biex tagħti l-akbar żoni u dawk l-iktar ċari ta' inibizzjoni mal-konċentrazzjonijiet varji ta' *bacitracin* taż-żingu.

7.2. *Il-preparazzjoni tal-pjanċi*

Id-diffużjoni permezz ta' l-agar hija mwettqa fi pjanċi bl-erba' konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (s_8, s_4, s_2 u s_1) u l-erba' konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni *assay* (u_8, u_4, u_2 u u_1). Dawn l-erba' konċentrazzjonijiet ta' estratt u standard għandhom neċessarjament jitqiegħdu f'kull pjanċa. Għal dan l-iskop, agħżel pjanċi kbar biżżejjed biex jippermettu mill-inqas tmien toqbiet b'dijametru ta' 10 sa 13-il mm u mhux inqas minn 30 mm bejn iċ-ċentri li għandhom isiru fil-*medium* ta' l-agar. It-test jista' jitwettaq fuq pjanċi li jikkonsistu f'folja tal-ħġieġ b'ċirku ta' superfiċi ta' l-aluminju jew tal-plastik imqiegħed fuq, 200 mm fi dijametru u 20 mm għoli.

Ferragħ fil-pjanċi kwantità tal-medium (4.2) imlaqqam bħal fil-punt 7.1, biex jagħti saff madwar 2 mm oħxon (60 ml għal pjanċa ta' 200 mm djametru), Ħallih joqgħod f'pożizzjoni livell, taqqab it-toqob u qegħidhom f'volumi mkejla eżatt ta' soluzzjonijiet *assay* u standard (bejn 0,10 u 0,15ml għal kull toqba, skond id-dijametru). Applika kull konċentrazzjoni mill-inqas erba' darbiet sabiex kull determinazzjoni hi soġġetta għal evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

7.3. *L-inkubazzjoni*

Inkuba l-pjanċi għal 16 sa 18-il siegħa fi 30 ± °C

8. **L-evalwazzjoni**

Kejjel id-djametru taż-żoni ta' inibizzjoni sa l-eqreb 0,1 mm. Irreġistra l-kejl medju għal kull konċentrazzjoni fuq karta grafika semilogaritimika li turi l-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet f'relazzjoni mad-dijametri taż-żoni ta' inibizzjoni. Pinġi l-linji ta' l-aħjar qagħda ta' kemm is-soluzzjoni standard u l-estratt, per eżempju bħal taħt.

Iddetermina l-punt ta' 'l-aħjar qagħda' għal-livell standard l-iktar baxx (SL) bl-użu tal-formula:

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

Iddetermina l-punt ta' 'l-aħjar qagħda' għall-livell standard l-iktar għoli (SH) bl-użu tal-formula:

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

Bl-istess mod, ikkalkula l-punti ta' 'l-aħjar qagħda' għal-livell ta' l-estratt l-iktar baxx (UL) u l-livell l-iktar għoli ta' l-estratt (UH) billi tissostitwixxi U_1, U_2, U_4 uU_8 għal S_1, S_2, S_4 u S_8 fil-formuli ta' hawn fuq.

Irreġistra l-valuri kkalkolati SL u SH fuq l-istess karta grafika u għaqqadhom biex tagħti l-linja ta' 'l-aħjar qagħda' għas-soluzzjoni standard. Bl-istess mod, irreġistra UL u UH u għaqqadhom biex tagħti l-linja ta' 'l-aħjar qagħda' għall-estratt.

Fl-assenza ta' xi interferenza l-linji għandhom ikunu paralleli. Għal skopijiet prattiċi l-linji jistgħu jiġu kkunsidrati paralleli jekk il-valuri (SH-SL) u (UH-UL) ma jvarjawx b'iktar minn 10 % mill-valur medju tagħhom.

Jekk il-linji jinstab li mhumiex paralleli, jew l-U_1 u s-S_1 jew l-U_8 u s-S_8 jistgħu jitwarrbu u s-SL, s-SH, l-UL u l-UH ikkalkulati, bl-użu tal-formuli alternattivi, biex jagħtu l-linji alternattivi ta' 'l-aħjar qagħda':

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

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

u l-istess għal UL u UH. L-istess kriterju ta' paralelliżmu għandu jiġi ssodisfat. Il-fatt li r-riżultat ġie kkalkolat minn tliet livelli għandu jiġi nnutat fir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bħala paralleli, ikkalkula l-logaritmu (log A) ta' l-attività relattiva (A) permezz ta' waħda mill-formuli li ġejjin, jiddependi fuq jekk tlieta jew erba' livelli intużawx għall-istima tal-paralelliżmu.

Għal erba' livelli

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

Għal tliet livelli

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

jew

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

Attività ta' l-estratt kampjun = attività ta' l-istandard rilevanti × A

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

Jekk l-attività relattiva tinsab barra l-firxa ta' 0,5 sa 2,0, imbagħad irrepeti l-assay bl-aġġustamenti approprjati għall-konċentrazzjonijiet ta' l-estratt jew, jekk dan mhuwiex possibbli, għas-soluzzjonijiet standard. Meta l-attività relattiva ma tistax tinġieb fil-firxa meħtieġa, kull riżultat ottenut għandu jiġi kkunsidrat bħala bejn wieħed u ieħor u dan għandu jiġi nnutat fuq ir-rapport finali.

Meta l-linji huma kkunsidrati bħala mhux paralleli, irrepeti d-determinazzjoni. Jekk il-paralelliżmu xorta ma jintlaħaqx, determinazzjoni sodisfaċenti ma tkunx intlaħqet.

Esprimi r-riżultat f'milligrammi ta' *bacitracin* taż-żingu għal kull kilogramma ta' għalf.

9. **Ir-rata ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun, mill-istess analist, m'għandhiex taqbeż:

— 2 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' bacitracin taż-żingu sa 10 mg/kg,

— 20 % relata ma' l-ogħla valur għal kontenuti ta' 10 sa 25 mg/kg,

— 5 mg/kg, f'valur assolut, għal kontenuti ta' 25 sa 50 mg/kg,

— 10 % relatat ma' l-ogħla valur għal kontenuti' l fuq minn 50 mg/kg.

---

(1) 1 mg għalf ta' grad ta' *bacitracin* taż-żingu hija ekwivalenti għal 42 unità internazzjonali (i.u.).
(a) Jistgħu jintużaw metodi oħrajn sakemm ikun ġie stabbilit li jagħtu sospensjonijiet simili tal-batterja.
(b) Kull medium kummerċjali tal-kultura ta' kompożizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati jista' jintuża."