31984L0004

SMERNICA KOMISIE
z 20. decembra 1983,
ktorá mení a dopĺňa smernice 71/393/EHS, 72/199/EHS a 78/633/EHS, zavádzajúce metódy analýzy na úradnú kontrolu krmív na území spoločenstva

(84/4/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód spoločenstva na vzorkovanie a analýzy na úradnú kontrolu krmív [1], naposledy zmenenú a doplnenú Aktom o pristúpení Grécka, najmä na jej článok 2,

keďže smernice Komisie 71/393/EHS [2], 72/199/EHS [3] a 78/633/EHS [4] určujú metódy na analýzy olejov a tukov, virginiamycínu a bacitracínu zinočnatého; keďže tieto metódy je potrebné nahradiť metódami, ktoré odrážajú pokrok vedeckých a technických poznatkov;

keďže opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

V prílohe smernice 71/393/EHS, časť IV „Stanovenie obsahu olejov a tukov“ sa nahrádza prílohou I k tejto smernici.

Článok 2

V prílohe II smernice 72/199/EHS časť 5 „Stanovenie obsahu virginiamycínu difúziou v agarovom médiu“ sa nahrádza prílohou II k tejto smernici.

Článok 3

V prílohe smernice 78/633/EHS časť 1 „Stanovenie obsahu bacitracínu zinočnatého difúziou v agarovom médiu“ sa nahrádza prílohou III k tejto smernici.

Článok 4

Členské štáty príjmu najneskôr do 1. júna 1984 zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou. Bezodkladne o tom budú informovať Komisiu.

Článok 5

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 20. decembra 1983.

Za Komisiu

Poul DALSAGER

člen Komisie

---

[1] Ú. v. ES. L 170, 3.8.1970, s. 2.
[2] Ú. v. ES. L 279, 20.12.1971, s. 7.
[3] Ú. v. ES. L 123, 29.5.1972, s. 6.
[4] Ú. v. ES. L 206, 29.7.1978, s. 43.

PRÍLOHA I

„4. **URČENIE OBSAHU SUROVÝCH OLEJOV A TUKOV**

1. **Účel a cieľ**

Táto metóda umožňuje určiť obsah olejov a tukov v krmivách. Nezahŕňa analýzu olejnatých semien a olejnatého ovocia definovaných v nariadení Rady 136/66/EHS z 22. septembra 1966.

V závislosti od druhu krmiva sa musí použiť jedna z dvoch opísaných metód.

1.1. *Metóda A*

Použiteľná na jednozložkové krmivá rastlinného pôvodu, s výnimkou tých, o ktorých sa vie, že obsahujú oleje a tuky, ktoré nie je možné úplne vyextrahovať pomocou petroléteru bez predchádzajúcej hydrolýzy. Medzi ne patria glutény, kvasnice, sójové a zemiakové bielkoviny. Táto metóda je použiteľná aj na kŕmne zmesi s výnimkou tých, ktoré obsahujú sušené mlieko alebo z ktorých nie je možné úplne vyextrahovať oleje a tuky pomocou petroléteru bez predchádzajúcej hydrolýzy.

1.2. *Metóda B*

Použiteľná na jednozložkové krmivá živočíšneho pôvodu ako aj krmivá uvedené v bode 1.1 ako výnimky pre metódu A.

2. **Podstata**

2.1. *Metóda A*

Pomocou petroléteru sa vyextrahuje vzorka. Rozpúšťadlo sa oddestiluje a zvyšok sa vysuší a odváži.

2.2. *Metóda B*

Vzorka sa upravuje kyselinou chlorovodíkovou za varu. Zmes sa ochladí a prefiltruje. Zvyšok sa premyje a vysuší a predloží na stanovenie obsahu pomocou metódy A.

3. **Činidlá**

3.1. Petroléter, rozmedzie varu: 40 až 60 °C. Brómové číslo musí byť menej ako 1 a zvyšok po odparení menej ako 2 mg/100 ml.

3.2. Síran sodný, bezvodý.

3.3. Kyselina chlorovodíková 3N.

3.4. Filtračná pomôcka, napr. kysličník kremičitý, Hyflo-supercel.

4. **Prístroje**

4.1. Extrakčný prístroj. Ak je vybavený násoskou (Soxhletov prístroj), spätný tok musí byť taký, aby vytvoril cca 10 cyklov za hodinu; v prípade prístroja bez násosky spätný tok musí byť približne 10 ml za minútu.

4.2. Extrakčné tuby neobsahujúce látky rozpustné v petroléteri, ktorých pórovitosť spĺňa požiadavky bodu 4.1.

4.3. Sušiareň buď vákuová nastavená na teplotu 75 ± 3 °C, alebo teplovzdušná nastavená na teplotu 100 ± 3 °C.

5. **Postup**

5.1. *Metóda A (pozri bod 8.1)*

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg, vložte ju do extrakčnej tuby (4.2) a zakryte chumáčom beztukovej vaty.

Vložte tubu do extrakčného prístroja (4.1) a extrahujte šesť hodín petroléterom (3.1). Petroléterový extrakt zachyťte do suchej odváženej banky obsahujúcej úlomky pemzy ([1]).

Oddestilujte rozpúšťadlo. Zvyšok po odparení vysušte tak, že banku ponecháte jeden a pol hodiny v sušiarni (4.3). Nechajte vychladnúť v exsikátore a odvážte. Znovu sušte 30 minút, aby hmotnosť olejov a tukov zostala nezmenená (strata hmotnosti medzi dvoma po sebe nasledujúcimi váženiami musí byť menšia ako 1 mg).

5.2. *Metóda B*

Navážte 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg (pozri bod 8.2), vložte ju do 400 ml kadičky alebo do 300 ml kónickej banky a pridajte 100 ml kyseliny chlorovodíkovej 3N (3.3) a úlomky pemzy. Kadičku zakryte hodinovým sklíčkom alebo na kónickú banku pripojte spätný chladič. Zmes uveďte do mierneho varu nad nízkym plameňom alebo na varnej platničke a varte jednu hodinu. Nedovoľte, aby sa produkt prilepil na stenu nádoby.

Ochladťe a pridajte dostatočné množstvo filtračnej pomôcky (3.4) na zabránenie akejkoľvek straty oleja a tuku počas filtrácie. Prefiltrujte cez navlhčený beztukový dvojitý filtračný papier. Zvyšok premývajte studenou vodou, kým nezískate neutrálny filtrát. Presvedčte sa, že filtrát neobsahuje žiaden olej ani tuky. Ich prítomnosť znamená, že vzorku treba pred hydrolýzou extrahovať pomocou petroléteru s použitím metódy A.

Dvojitý filtračný papier so zvyškom položte na hodinové sklo a sušte jeden a pol hodiny v sušiarni pri teplote 100 ± 3 °C.

Dvojitý filtračný papier obsahujúci suchý zvyšok vložte do extrakčnej tuby (4.2) a zakryte chumáčom beztukovej vaty. Patrónu vložte to extrakčného prístroja (4.1) a použite postup opísaný v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

6. **Vyjadrenie výsledku**

Hmotnosť zvyšku vyjadrite ako percento vzorky.

7. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch súbežných stanovení vykonaných na tej istej vzorke tým istým analytikom nesmie presiahnuť:

— 0,2 % v absolútnej hodnote pri obsahu olejov a tukov nižšom ako 5 %,

— 4,0 % z najvyššieho výsledku pri obsahu 5 až 10 %,

— 0,4 % v absolútnej hodnote pri obsahu nad 10 %.

8. **Pozorovania**

8.1. Pri produktoch s vyšším obsahom olejov a tukov, ktoré sa nedajú rozdrviť alebo nie sú vhodné na získanie homogénnej zredukovanej skúšobnej vzorky, použite nasledujúci postup:

Navážte 20 g vzorky s presnosťou na 1 mg a zmiešajte s 10 g alebo s väčším množstvom bezvodého síranu sodného (3.2). Extrahujte pomocou petroléteru (3.1) podľa bodu 5.1. Získaný extrakt doplňte do 500 ml petroléterom (3.1) a zhomogenizujte. Odoberte 50 ml roztoku a preneste do malej, suchej, odváženej banky obsahujúcej úlomky pemzy ([1]). Oddestilujte rozpúšťadlo, vysušte a použite postup opísaný v poslednom odseku bodu 5.1.

Odstráňte rozpúšťadlo zo zvyšku po extrakcii, ktorý zostal v tube, rozdrvte zvyšok na jemnosť o veľkosti častíc do 1 mm, vráťte ho do extrakčnej tuby (bez pridania síranu sodného) a použite postup opísaný v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

Vypočítajte obsah olejov a tukov ako percento vzorky pomocou nasledujúceho vzorca:

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

kde:

a = hmotnosť v gramoch zvyšku po prvej extrakcii (alikvótna časť extraktu),

b = hmotnosť v gramoch zvyšku po druhej extrakcii.

8.2. Pri produktovh s nízkym obsahom olejov a tukov množstvo skúšobnej vzorky môžete zvýšiť na 5 g.

([1]) Ak olej alebo tuk musí byť podrobený následným skúškam kvality, úlomky pemzy nahraďte sklenými perlami.“

PRÍLOHA II

„5. **Stanovenie obsahu virginiamycínu**

— difúziou v agarovom médiu —

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda slúži na stanovenie obsahu virginiamycínu v krmivách a v premixoch. Dolná medza stanoviteľnosti je 2 mg/kg (2 ppm) (1).

2. **Podstata**

Vzorka sa extrahuje pomocou metylalkoholového roztoku Tween 80. Extrakt sa dekantuje alebo odstredí a zriedi. Jeho antibiotická aktivita sa určí zmeraním difúzie virginiamycínu v agarovom médiu, naočkovanom mikroorganizmom *Micrococcus luteus*. Difúzia sa prejaví vznikom inhibičných zón mikroorganizmu. Priemer týchto zón sa považuje za priamo úmerný logaritmu koncentrácie antibiotík v celom rozsahu použitých koncentrácií antibiotík.

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

3.1. *Udržiavanie zásobnej kultúry*

Naočkujte šikmé plochy kultivačného média (4.1) v skúmavkách mikroorganizmom *Micrococcus luteus* a inkubujte 24 hodín pri teplote 30 °C. Skladujte kultúru v chladničke pri teplote asi 4 °C. Preočkujte každé dva týždne.

3.2. *Príprava bakteriálnej suspenzie* (a)

Zozbierajte produkt z čerstvo pripravenej šikmej plochy agaru (3.1) pomocou 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Túto suspenziu použite na naočkovanie 250 ml kultivačného média (4.1), v Rouxovej banke a inkubujte 18 až 20 hodín pri teplote 30 °C. Zozbierajte produkt do 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a zamiešajte. Zrieďte suspenziu na 1/10 pomocou roztoku chloridu sodného (4.3). Priechod svetla suspenziou musí byť asi 75 %, meraný pri 650 nm v kyvete o priemere 1 cm oproti roztoku chloridu sodného (4.3). Túto suspenziu možno skladovať 1 týždeň pri teplote cca 4 °C.

4. **Kultivačné médiá a činidlá**

4.1. *Kultivačné a skúšobné médium* (b)

Mäsový bujón	6,0 g
Tryptón	4,0 g
Kvasinkový extrakt	3,0 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml

ph 6,5 (po sterilizácii).

4.2. *Fosfátový pufer, pH 6*

Hydrofosforečnan draselný, K_2HPO_4	2,0 g
Dihydrofosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,0 g
Voda do	1 000 ml

4.3. Chlorid sodný, roztok 0,8 % (w/v): rozpustite 8 g chloridu sodného vo vode a zrieďte na 1 000 ml; sterilizujte.

4.4. Metylalkohol.

4.5. Zmes fosfátového pufra (4.2)/metylalkoholu (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Tween 80 metylalkoholový roztok 0,5 %: rozpustite 5 g Tween 80 v metylalkohole (4.4) a zrieďte metylalkoholom na 1 000 ml.

4.7. Štandardná látka: virginiamycín o známej aktivite.

5. **Štandardné roztoky**

Rozpustite presne navážené množstvo štandardnej látky (4.7) v metylalkohole (4.4) a zrieďte metylalkoholom (4.4), aby ste dostali zásobný roztok obsahujúci 1 000 µg virginiamycínu na ml.

Tento roztok, skladovaný v uzatvorenej banke pri teplote 4 °C, zostane stabilný až päť dní.

Z tohto zásobného roztoku pripravte postupným riedením pomocou zmesi (4.5) nasledujúce roztoky:

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

6. **Príprava extraktu a skúšobných roztokov**

6.1. *Extrakcia*

6.1.1. Produkty s obsahom virginiamycínu do 100 mg/kg

Navážte 50 g vzorky, pridajte 200 ml roztoku (4.6) a trepte 30 minút. Nechajte usadiť alebo odstreďte, odoberte 20 ml supernatantu (vyčíreného roztoku) a odparte na cca 5 ml v rotačnej odparke pri teplote nepresahujúcej 40 °C. Zvyšok zrieďte zmesou (4.5), aby ste získali očakávaný obsah virginiamycínu 1 µg/ml (= u_8).

6.1.2. Produkty s obsahom virginiamycínu nad 100 mg/kg

Navážte vzorku o množstve najviac 10,0 g a obsahujúce 1 až 50 mg virginiamycínu, pridajte 100 ml roztoku (4.6) a trepte 30 minút. Nechajte usadiť alebo odstreďte a potom zrieďte supernantant so zmesou (4.5), aby ste získali očakávaný obsah virginiamycínu 1 µg/ml (= u_8).

6.2. *Skúšobné roztoky*

Z roztoku u_8 pripravte roztoky u_4 (očakávaný obsah: 0,5 µg/ml), u_2 (očakávaný obsah. 0,25 µg/ml) a u_1 (očakávaný obsah. 0,125 µg/ml) postupným riedením (1 + 1) zmesou (4.5).

7. **Skúšobný postup**

7.1. *Očkovanie skúšobného média*

Naočkujte skúšobné médium (4.1) bakteriálnou suspenziou (3.2) pri teplote cca 50 °C. Predbežnými skúškami na platniach s médiom (4.1) stanovte množstvo bakteriálnej suspenzie, potrebné na vznik najväčších a najzreteľnejších inhibičných zón s rôznymi koncentráciami virginiamycínu.

7.2. *Príprava platní*

Difúzia v agare sa vykoná na platniach so štyrmi koncentráciami štandardného roztoku (s_8, s_4, s_2 a s_1) a štyrmi koncentráciami skúšobného roztoku (u_8, u_4, u_2 a u_1). Tieto štyri koncentrácie extraktu a štandardného roztoku sa musia umiestniť na každú platňu. Preto vyberte dostatočne veľké platne, ktoré umožnia vytvoriť v agare aspoň osem jamiek o priemere 10 až 13 mm a aspoň s 30 mm odstupom medzi ich stredmi. Skúšku môžete vykonať na sklenených platniach s hliníkovým alebo umelohmotným prstencom o priemere 200 mm a výške 20 mm, pripevneným na nich.

Nalejte na platne médium (4.1) naočkované podľa bodu 7.1 v takom množstve, aby ste získali vrstvu s približnou hrúbkou 2 mm (60 ml na platňu s priemerom 200 mm). Nechajte stuhnúť vo vodorovnej polohe, vyvŕtajte jamky a nalejte do nich presne odmerané množstvá skúšobných a štandardných roztokov (od 0,10 do 0,15 ml do jednej jamky, v závislosti od priemeru). Každú koncentráciu aplikujte aspoň štyri razy, aby bolo každé stanovenie predmetom hodnotenia 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Inkubujte platne 16 až 18 hodín pri teplote 30 ± 2 °C.

8. **Hodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón s presnosťou na 0,1 mm. Zaznamenajte priemerné hodnoty meraní každej koncentrácie na semilogaritmický papier, znázorniac logaritmus koncentrácií vo vzťahu k priemerom inhibičných zón. Zakreslite optimálnu rastovú krivku štandardného roztoku aj extraktu podľa nižšie uvedeného príkladu:

Stanovte ‚optimálny' rastový bod na najnižšiu koncentráciu štandardu (SL) pomocou vzorca:

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

Stanovte ‚optimálny' rastový bod na najvyššiu koncentráciu štandardu (SH) pomocou vzorca:

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

Obdobne vypočítajte ‚optimálne' rastové body na najnižšiu koncentráciu extraktu (UL) a najvyššiu koncentráciu extraktu (UH), pričom s_1, s_2, s_4 a s_8 vo vzorci uvedenom vyššie nahradíte hodnotami u_1, u_2, u_4 a u_8.

Vypočítané hodnoty SL a SH zaznamenajte na ten istý grafický papier a spojte ich, aby ste získali ‚optimálnu' rastovú krivku na štandardný roztok. Obdobne zaznamenajte UL a UH a spojte ich, čím získate ‚optimálnu' rastovú krivku na extrakt.

Ak neexistujú žiadne interferencie, krivky majú byť rovnobežné. Z praktických dôvodov krivky možno považovať za rovnobežné, ak hodnoty (SH – SL) a (UH – UL) sa neodlišujú od svojej priemernej hodnoty o viac ako 10 %.

Ak krivky nie sú rovnobežné, môžete vynechať buď u_1 a s_1 alebo u_8 a s_8 a vypočítať SL, SH, UL a UH pomocou alternatívnych vzorcov, aby ste získali alternatívne krivky ‚optimálneho' rastu:

a′) $SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6}$ alebo $\frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$

b′) $SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6}$ alebo $\frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$

a obdobne pre UL a UH. Musia byť splnené rovnaké kritériá rovnobežnosti. V záverečnej správe treba uviesť, že výsledok bol vypočítaný z troch koncentrácií.

Keď sa krivky považujú za rovnobežné, vypočítajte logaritmus relatívnej aktivity (log A) pomocou jedného z nasledujúcich vzorcov podľa toho, či pri hodnotení rovnobežnosti boli použité tri alebo štyri koncentrácie.

Pre štyri koncentrácie

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

Pre tri koncentrácie

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

alebo

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

Aktivita skúšobného extraktu = aktivita príslušného štandardu x A

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

Ak sa relatívna aktivita nachádza mimo rozsahu 0,5 až 2,0, zopakujte skúšku, pričom vhodne upravte koncentrácie extraktu alebo ak to nie je možné, koncentrácie štandardných roztokov. Ak nie je možné dosiahnuť, aby relatívna aktivita bola v požadovanom rozpätí, každý získaný výsledok musí byť považovaný za približný a túto skutočnosť treba uviesť v záverečnej správe.

Keď sa krivky nepovažujú za rovnobežné, zopakujte stanovenie. Ak ani potom nedosiahnete rovnobežnosť, stanovenie musíte považovať za neuspokojivé.

Výsledok vyjadrite v miligramoch virginiamycínu na kilogram krmiva.

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch súbežných stanovení, vykonaných na tej istej vzorke tým istým analytikom, nesmie presiahnuť:

— 2 mg/kg v absolútnej hodnote pri obsahoch virginiamycínu do 10mg/kg,

— 20 % z najvyššej hodnoty pri obsahoch od 10 do 25 mg/kg,

— 5 mg/kg v absolútnej hodnote pri obsahoch od 25 do 50 mg/kg,

— 10 % z najvyššej hodnoty pri obsahoch nad 50 mg/kg.

([1]) 1 mg virginiamycínu zodpovedá 1 000 britských jednotiek.

([a]) Iné metódy sa môžu použiť, ak bolo zistené, že poskytujú obdobné bakteriálne suspenzie.

([b]) Možno použiť akékoľvek komerčné kultivačné médium obdobného zloženia, ktoré poskytuje rovnaké výsledky.“

PRÍLOHA III

„1. **URČENIE OBSAHU BACITRACÍNU ZINOČNATÉHO**

— difúziou v agarovom médiu —

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda slúži na stanovenie obsahu bacitracínu zinočnatého v krmivách a premixoch. Dolná medza stanoviteľnosti je 5 mg/kg (5 ppm) ([1]).

2. **Podstata**

Vzorka sa extrahuje pri pH 2 pomocou zmesi metylalkoholu/vody/kyseliny chlorovodíkovej a roztoku síranu sodného. Pridaním síranu sodného sa vyzrážajú všetky rozpustné soli medi, ktoré môžu rušivo pôsobiť pri rozbore. Hodnota pH extraktu sa upraví na 6,5, extrakt sa koncentruje (ak je to potrebné) a zriedi. Jeho antibiotická aktivita sa stanoví zmeraním difúzie bacitracínu zinočnatého v agarovom médiu naočkovanom mikroorganizmom *Micrococcus luteus* (*flavus*). Difúzia sa prejaví tvorbou inhibičných zón mikroorganizmu. Vzťah medzi priemerom týchto zón a logaritmom koncentrácie antibiotika v rozsahu použitých antibiotických koncentrácií sa považuje za priamo úmerný.

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

3.1. *Udržiavanie zásobnej kultúry*

Naočkujte šikmé plochy kultivačného média (4.1) mikroorganizmom *Micrococcus luteus (flavus)* a inkubujte 24 hodín pri teplote 30 °C. Skladujte kultúru v chladničke pri teplote asi 4 °C. Preočkujte každé dva týždne.

3.2. *Príprava bakteriálnej suspenzie* ([a])

Zozbierajte produkt z čerstvo pripravenej šikmej plochy agaru (3.1) pomocou 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Túto suspenziu použite na naočkovanie 250 ml kultivačného média (4.1), v Rouxovej banke a inkubujte 18 až 20 hodín pri teplote 30 °C. Zozbierajte produkt do 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a zamiešajte. Zrieďte suspenziu na 1/10 pomocou roztoku chloridu sodného (4.3). Priechod svetla suspenziou musí byť asi 75 %, meraný pri 650 nm v kyvete o priemere 1 cm oproti roztoku chloridu sodného (4.3). Túto suspenziu možno skladovať 1 týždeň pri teplote asi 4 °C.

4. **Kultivačné médiá a činidlá**

4.1. *Kultivačné médium* ([b])

Mäsový bujón	6,0 g
Tryptón	4,0 g
Kvasinkový extrakt	3,0 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml

ph 6,5 až 6,6 (po sterilizácii).

4.2. *Skúšobné médium* ([c])

Tryptón	10,0 g
Kvasinkový extrakt	3,0 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Tween 80	1 ml
Voda	1 000 ml

ph 6,5 (po sterilizácii)

4.3. Chlorid sodný, roztok 0,8 % (w/v): rozpustite 8 g chloridu sodného vo vode a zrieďte na 1 000 ml; sterilizujte.

4.4. Zmes metylalkoholu, vody a kyseliny chlorovodíkovej (4.6):

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

4.5. *Fosfátový pufer, pH 6,5:*

Hydrofosforečnan draselný, K_2HPO_4	22,15 g
Dihydrofosforečnan draselný, KH_2PO_4	27,85 g
Voda do	1 000 ml

4.6. Kyselina chlorovodíková (d: 1,18 až 1,19).

4.7. Kyselina chlorovodíková (0,1 M).

4.8. Hydroxid sodný — roztok 1 M

4.9. Síran sodný — roztok cca 0,5 M.

4.10. Brómkrezolová červeň, roztok 0,04 % (w/v): rozpustite 0,1 g brómkrezolovej červene v 18,5 ml roztoku hydroxidu sodného 0,01 M. Doplňte do 250 ml vodou a zamiešajte.

4.11. Štandardná látka: bacitracín zinočnatý o známej aktivite (v m.j.).

5. **Štandardné roztoky**

Navážte také množstvo štandardu bacitracínu zinočnatého (4.11), ktoré obsahuje 1 050 m.j. (podľa uvedenej aktivity). Pridajte 5 ml kyseliny chlorovodíkovej 0,1 M (4.7) a nechajte stáť 15 minút. Pridajte 30 ml vody, upravte pH na hodnotu 4,5 pomocou fosfátového pufra (4.5) (cca 4 ml), doplňte do 50 ml vodou a dobre zamiešajte (1 ml = 21 m.j.).

Z tohto roztoku pripravte postupným riedením pomocou fosfátového pufra (4.5) nasledujúce roztoky:

s_8	0,42	m.j./ml
s_4	0,21	m.j./ml
s_2	0,105	m.j./ml
s_1	0,0525	m.j./ml

6. **Príprava extraktu a skúšobných roztokov**

6.1. *Extrakcia*

6.1.1. Premixy a minerálne krmivá

Navážte vzorku o množstve 2,0 až 5,0 g, pridajte 29,0 ml zmesi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a krátko pretrepte. Skontrolujte, či pH je približne 2. Trepte 10 minút, pridajte 30 ml fosfátového pufra (4.5), trepte 15 minút a odstreďte. Odoberte vhodnú alikvótnu časť supernatantu a upravte pH na 6,5 roztokom hydroxidu 1 M (4.8) pomocou pH-metra alebo roztokom brómkrezolovej červene (4.10) ako indikátorom. Zrieďte fosfátovým pufrom (4.5), aby ste získali očakávaný obsah bacitracínu zinočnatého 0,42 m.j./ml (= u_8).

6.1.2. Bielkovinové koncentráty

Navážte vzorku o množstve 10,0, pridajte 49,0 ml zmesi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a krátko pretrepte. Skontrolujte, či pH je približne 2. Trepte 10 minút. Pridajte 50 ml fosfátového pufra (4.5), trepte 15 minút a odstreďte. Odoberte vhodnú alikvótnu časť supernatantu a upravte pH na 6,5 roztokom hydroxidu 1 M (4.8) pomocou pH-metra alebo roztokom brómkrezolovej červene (4.10) ako indikátorom. Odparte na približne polovičné množstvo v rotačnej odparke pri teplote nepresahujúcej 35 °C.

Zrieďte fosfátovým pufrom (4.5), aby ste získali očakávaný obsah bacitracínu zinočnatého 0,42 m.j./ml (= u_8).

6.1.3. Ostatné krmivá

Navážte vzorku o množstve 10,0 g (20,0 g pri očakávanom obsahu bacitracínu zinočnatého 5 mg/kg). Pridajte zmes 24,0 ml zmesi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a homogenizujte 10 minút. Pridajte 25 ml fosfátového pufra (4.5), trepte 15 minút a odstreďte. Odoberte 20 ml supernatantu a upravte pH na 6,5 roztokom hydroxidu 1 M (4.8) pomocou pH-metra alebo roztokom brómkrezolovej červene (4.10) ako indikátorom. Odparte na približne 4 ml v rotačnej odparke pri teplote nepresahujúcej 35 °C. Zvyšok zrieďte fosfátovým pufrom (4.5), aby ste získali očakávaný obsah bacitracínu zinočnatého 0,42 m.j./ml (= u_8).

6.2. *Skúšobné roztoky*

Z roztoku u_8 pripravte roztoky u_4 (očakávaný obsah: 0,21 m.j./ml), u_2 (očakávaný obsah. 0,105 m.j./ml) a u_1 (očakávaný obsah: 0,0525 m.j./ml) postupným riedením (1 + 1) pomocou fosfátového pufra (4.5).

7. **Skúšobný postup**

7.1. *Očkovanie skúšobného média*

Naočkujte skúšobné médium (4.2) bakteriálnou suspenziou (3.2) pri teplote cca 50 °C. Predbežnými skúškami na platniach so skúšobným médiom (4.2) stanovte množstvo bakteriálnej suspenzie potrebné na vznik najväčších a najzreteľnejších inhibičných zón s rôznymi koncentráciami bacitracínu zinočnatého.

7.2. *Príprava platní*

Difúzia v agare sa vykoná na platniach so štyrmi koncentráciami štandardného roztoku (s_8, s_4, s_2 a s_1) a štyrmi koncentráciami skúšobného roztoku (u_8, u_4, u_2 a u_1). Tieto štyri koncentrácie extraktu a štandardu sa musia umiestniť na každú platňu. Preto vyberte dostatočne veľké platne, ktoré umožnia vytvoriť v agarovom médiu aspoň osem jamiek o priemere 10 až 13 mm a najmenej s 30 mm odstupom medzi ich stredmi. Skúšku môžete vykonať na sklenených platniach s hliníkovým alebo umelohmotným prstencom o priemere 200 mm a výške 20 mm, pripevnených na nich.

Nalejte na platne médium (4.2) naočkované podľa bodu 7.1 v takom množstve, aby ste získali vrstvu s približnou hrúbkou 2 mm (60 ml na platňu s priemerom 200 mm). Nechajte stuhnúť vo vodorovnej polohe, vyvŕtajte jamky a nalejte do nich presne odmerané množstvá skúšobných a štandardných roztokov (od 0,10 do 0,15 ml do jednej jamky, v závislosti od priemeru). Každú koncentráciu aplikujte aspoň štyri razy, aby bolo každé stanovenie predmetom hodnotenia 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Inkubujte platne 16 až 18 hodín pri teplote 30 ± 2 °C.

8. **Hodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón s presnosťou na 0,1 mm. Zaznamenajte priemerné hodnoty meraní každej koncentrácie na semilogaritmický papier, znázorňujúci logaritmus koncentrácií vo vzťahu k prie merom inhibičných zón. Zakreslite ‚optimálnu' rastovú krivku štandardu aj extraktu podľa nižšie uvedeného príkladu:

Stanovte ‚optimálny' rastový bod na najnižšiu koncentráciu štandardu (SL) pomocou vzorca:

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

Stanovte ‚optimálny' rastový bod na najvyššiu koncentráciu štandardu (SH) pomocou vzorca:

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

Obdobne vypočítajte ‚optimálne' rastové body na najnižšiu koncentráciu extraktu (UL) a najvyššiu koncentráciu extraktu (UH), pričom s_1, s_2, s_4 a s_8 vo vzorci uvedenom vyššie nahradíte hodnotami u_1, u_2, u_4 a u_8.

Vypočítané hodnoty SL a SH zaznamenajte na ten istý grafický papier a spojte ich, aby ste získali ‚optimálnu' rastovú krivku na štandardný roztok. Obdobne zaznamenajte UL a UH a spojte ich, čím získate ‚optimálnu' rastovú krivku na extrakt.

Ak neexistujú interferencie, krivky majú byť rovnobežné. Z praktických dôvodov krivky možno považovať za rovnobežné, ak hodnoty (SH — SL) a (UH — UL) sa neodlišujú od svojej priemernej hodnoty o viac ako 10 %.

Ak krivky nie sú rovnobežné, môžete vynechať buď u_1 a s_1 alebo u_8 a s_8 a SL, SH, UL a UH vypočítať pomocou alternatívnych vzorcov, aby ste získali alternatívne krivky ‚optimálneho' rastu:

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

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

a obdobne pre UL a UH. Musia byť splnené rovnaké kritériá rovnobežnosti. V záverečnej správe treba uviesť, že výsledok bol vypočítaný z troch koncentrácií.

Keď sa krivky považujú za rovnobežné, vypočítajte logaritmus relatívnej aktivity (log A) pomocou jedného z nasledujúcich vzorcov podľa toho, či pri hodnotení rovnobežnosti boli použité tri alebo štyri koncentrácie.

Pre štyri koncentrácie

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

Pre tri koncentrácie

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

alebo

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

Aktivita skúšobného extraktu = aktivita príslušného štandardu × A

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

Ak sa relatívna aktivita nachádza mimo rozsahu 0,5 až 2,0, zopakujte skúšku, pričom vhodne upravte koncentrácie extraktu alebo ak to nie je možné, koncentrácie štandardných roztokov. Ak nie je možné dosiahnuť, aby relatívna aktivita bola v požadovanom rozpätí, každý získaný výsledok musí byť považovaný za približný a túto skutočnosť treba uviesť v záverečnej správe.

Keď sa krivky nepovažujú za rovnobežné, zopakujte stanovenie. Ak ani potom nedosiahnete rovnobežnosť, stanovenie musíte považovať za neuspokojivé.

Výsledok vyjadrite v miligramoch bacitracínu zinočnatého na kilogram krmiva.

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch stanovení, vykonaných na tej istej vzorke tým istým analytikom, nesmie presiahnuť:

— 2 mg/kg v absolútnej hodnote pri obsahoch bacitracínu zinočnatého do 10 mg/kg,

— 20 % z najvyššej hodnoty pri obsahoch od 10 do 25 mg/kg,

— 5 mg/kg v absolútnej hodnote pri obsahoch od 25 do 50 mg/kg,

— 10 % z najvyššej hodnoty pri obsahoch nad 50 mg/kg.

([1]) 1 mg bacitracínu zinočnatého v krmive zodpovedá 42 medzinárodným jednotkám (m.j.).

([a]) Iné metódy sa môžu použiť, ak bolo zistené, že poskytujú obdobné bakteriálne suspenzie.

([b]) Možno použiť akékoľvek komerčné kultivačné médium obdobného zloženia, ktoré poskytuje rovnaké výsledky.“