31984L0004

DIRECTIVA COMISIEI
din 20 decembrie 1983
de modificare a Directivelor 71/393/CEE, 72/199/CEE și 78/633/CEE de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

(84/4/CEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor (1), modificată ultima dată de Actul de aderare a Greciei, în special articolul 2,

întrucât Directivele 71/393/CEE (2), 72/199/CEE (3) și 78/633/CEE ale Comisiei (4) stabilesc metodele de dozare a materiilor grase brute pentru virginiamicină și bacitracin-zinc; întrucât trebuie înlocuite aceste metode cu metode adaptate la evoluția cunoștințelor științifice și tehnice;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent privind furajele,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

La anexa la Directiva 71/393/CEE, textul din partea IV, „Dozarea materiilor grase brute", se înlocuiește cu textul din anexa I la prezenta directivă.

Articolul 2

La anexa II la Directiva 72/199/CEE, textul din partea 5, „Dozarea virgiamicinei prin difuzare pe geloză", se înlocuiește cu textul din anexa II la prezenta directivă.

Articolul 3

La anexa la Directiva 78/633/CEE, textul din partea 1, „Dozarea bacitracinei-zinc prin difuzare pe geloză", se înlocuiește cu textul din anexa III la prezenta directivă.

Articolul 4

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 1 iunie 1984. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Articolul 5

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 20 decembrie 1983.

Pentru Comisie

Poul DALSAGER

Membru al Comisiei

(1) JO L 170, 3.8.1970, p. 2.
(2) JO L 279, 20.12.1971, p. 7.
(3) JO L 123, 29.5.1972, p. 6.
(4) JO L 206, 29.7.1978, p. 43.

ANEXA I

„4. **DOZAREA MATERIILOR GRASE BRUTE**

1. **Obiect și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea cantității de materii grase brute din furaje. Ea nu se referă la analiza semințelor și a fructelor oleaginoase definite în Regulamentul nr. 136/66/CEE al Consiliului din 22 septembrie 1966.

În funcție de tipul furajelor, se aplică unul dintre procedeele descrise mai jos.

1.1. *Procedeul A*

Se aplică în cazul furajelor de origine vegetală, cu excepția celor care conțin materii grase care nu pot fi extrase complet cu eter de petrol fără hidroliză prealabilă. Glutenii, drojdiile, proteinele din soia și cartofi sunt astfel de excepții. Acest procedeu se aplică și în cazul alimentelor compuse, cu excepția celor care conțin lapte praf sau pentru care materiile grase nu se pot extrage total cu eter de petrol fără hidroliză prealabilă.

1.2. *Procedeul B*

Se aplică în cazul furajelor simple de origine animală, precum și în cazul furajelor menționate la punctul 1.1 ca excepții la aplicarea procedeului A.

2. **Principiu**

2.1. *Procedeul A*

Proba se extrage cu eter de petrol. Solventul se distilează, iar reziduul se usucă și se cântărește.

2.2. *Procedeul B*

Proba se tratează la cald cu acid clorhidric. Amestecul se răcește și se filtrează. După spălare și uscare, reziduul se analizează conform procedeului A.

3. **Reactivi**

3.1. Eter de petrol, interval de fierbere: 40-60 °C. Indicele de brom trebuie să fie sub 1, iar reziduul de evaporare sub 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfat de sodiu anhidru.

3.3. Acid clorhidric 3 N.

3.4. Adjuvant de filtrare, de exemplu pământ de diatomee, Hyflo-supercel.

4. **Aparatură**

4.1. Extractor. Dacă aparatul este prevăzut cu un sifon (aparat Soxhlet), debitul de reflux trebuie să fie astfel reglat, încât să se obțină cel puțin 10 cicluri pe oră. În cazul în care este un aparat fără sifon, debitul lichidului care se întoarce trebuie să fie de aproximativ 10 ml pe minut.

4.2. Cartușe de extracție, fără materii solubile în eter de petrol, cu o porozitate compatibilă cu cerințele prevăzute la punctul 4.1.

4.3. Etuvă de uscare, fie în vid, la 75 °C ± 3 °C, fie la o presiune atmosferică de 100 °C ± 3 °C.

5. **Mod de operare**

5.1. *Procedeul A* (a se vedea observația de la punctul 8.1)

Se cântăresc, cu o toleranță de 1 mg, 5 g de probă, se introduc într-un cartuș de extracție (4.2) și se acoperă cu un tampon de bumbac degresat.

Se introduce cartușul în extractor (4.1) și se fac extracții cu eter de petrol (3.1) timp de șase ore. Se adună cantitatea extrasă într-un balon de sticlă uscat și cântărit în care se află bucăți de piatră ponce [1].

Se elimină solventul prin distilare. Se usucă reziduul prin așezarea balonului timp de o oră și jumătate într-o etuvă de uscare (4.3). Se lasă să se răcească într-un uscător, după care se cântărește. Se usucă din nou timp de 30 de minute pentru a fi siguri că greutatea materiei grase rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive nu trebuie să depășească 1 mg).

5.2. *Procedeul B*

Se cântăresc, cu o toleranță de 1 mg, 2,5 g de probă (a se vedea observația de la punctul 8.2), se introduc într-un cilindru de 400 ml sau într-o fiolă conică de 300 ml și se adaugă 100 ml de acid clorhidric 3 N (3.3) și câteva bucăți de piatră ponce. Se acoperă cilindrul cu o sticlă de ceas, iar fiola conică cu un răcitor cu reflux. Se aduce amestecul la fierbere lentă cu ajutorul unei flăcări mici sau a unui reșou și se menține astfel timp de o oră. Produsul nu trebuie să se prindă de pereții recipientului.

Se răcește și se adaugă o cantitate suficientă de adjuvant de filtrare (3.4), astfel încât să fie evitată orice pierdere de materie grasă în momentul filtrării. Se filtrează cu ajutorul unei hârtii de filtru duble și umezite, fără materii grase. Reziduul se spală cu apă rece până la obținerea unui filtrat neutru. Verificați ca filtratul să nu conțină materii grase. Prezența acestora indică necesitatea efectuării extragerii de eșantion cu eter de petrol conform procedeului A înainte de hidroliză.

Se așază hârtia de filtru dublă cu reziduul pe o sticlă de ceas și se usucă timp de o oră și jumătate în etuvă, la 100 °C ± 3 °C.

Se introduce hârtia de filtru dublă cu reziduul uscat într-un cartuș de extracție (4.2) și se acoperă cu un tampon de bumbac degresat. Se pune cartușul într-un extractor (4.1) și se continuă modul de operare conform indicațiilor de la punctul 5.1 al doilea și al treilea paragraf.

6. **Calcularea rezultatelor**

Rezultatul cântăririi probei se exprimă în procente.

7. **Repetabilitate**

Diferențele dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe aceeași probă de același analist nu trebuie să depășească:

— 0,2 % în valoare absolută, pentru conținutul în materie grasă brută mai mic de 5 %;

— 4,0 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut între 5 și 10 %;

— 0,4 % în valoare absolută pentru un conținut de peste 10 %.

8. **Observații**

8.1. Pentru produsele cu conținut ridicat de materii grase, greu de mărunțit sau inadecvate pentru prelevarea unei probe de încercare omogenă, se procedează în felul următor.

Se cântăresc, cu o toleranță de 1 mg, 20 de mg de probă și se amestecă cu 10 sau peste 10 g de sulfat de sodiu anhidru (3.2). Se extrage cu eter de petrol (3.1) conform indicațiilor de la punctul 5.1. Se completează extrasul obținut cu eter de petrol (3.1) până la 500 ml și se omogenizează. Se introduc 50 ml de soluție într-un balon de sticlă uscat și cântărit, în care se află câteva bucăți de piatră ponce ([1]). Se elimină solventul prin distilare, se usucă și se continuă modul de operare conform indicațiilor de la punctul 5.1 ultimul paragraf.

Se elimină solventul din reziduul de extracție care se află în cartuș, se mărunțește reziduul în bucăți de 1 mm, se pune din nou în cartuș (nu se adaugă sulfat de sodiu) și se continuă procedura conform indicațiilor de la punctul 5.1 al doilea și al treilea paragraf.

Conținutul de materii grase brute în procente de eșantioane se calculează după formula:

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

unde:

a = masa, în grame, a reziduului de la prima extracție (partea alicotă a extrasului),

b = masa, în grame, a reziduului de la a doua extracție.

8.2. Priza de încercare a produselor sărace în materii grase poate fi mărită la 5 g.

([1]) Bucățile de piatră ponce se înlocuiesc cu mărgeluțe de sticlă în cazul în care materia grasă trebuie să fie ulterior examinată calitativ."

ANEXA II

„5. **DOZAREA VIRGINIAMICINEI**

— prin difuzare pe geloză —

1. **Obiect și domeniu de aplicare**

Metoda permite dozarea virginiamicinei în furaje și amestecuri primare. Limita inferioară a dozării este de 2 mg/kg (2 ppm) [1].

2. **Principiu**

Proba este supusă unei extracții printr-o soluție metanolică de Tween 80. Extrasul se decantează sau centrifughează, apoi se diluează. Activitatea antibiotică a acestuia se determină prin măsurarea difuzării virginiamicinei într-un mediu de geloză, însămânțat cu *Micrococcus luteus*. Difuzarea se observă prin formarea zonelor de inhibiție ale microorganismului. Diametrul acestor zone este considerat direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotic pentru gama de concentrații utilizate.

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

3.1. *Întreținerea sușei*

Se însămânțează mediul de cultură (4.1), în tuburi înclinate, cu *Micrococcus luteus*. Se incubează timp de 24 de ore la 30 °C, se păstrează la frigider la aproximativ 4 °C și se însămânțează din nou o dată la două săptămâni.

3.2. *Pregătirea suspensiei bacteriene [a]*

Se recoltează germenii dintr-un tub de geloză (3.1) pregătit recent, cu ajutorul a 2-3 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3). Se însămânțează cu această suspensie 250 ml din mediul de cultură (4.1) într-o fiolă Roux și se incubează timp de 18-20 de ore la 30 °C. Se recoltează germenii în 25 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3) și se omogenizează. Se diluează suspensia la 1/10 cu ajutorul soluției de clorură de sodiu (4.3). Transmisia luminoasă a suspensiei, măsurată la 650 nm la o grosime de 1 cm trebuie să fie, prin comparație cu soluția de clorură de sodiu, de aproximativ 75 %. Suspensia poate fi păstrată timp de o săptămână la aproximativ 4 °C.

4. **Medii de cultură și reactivi**

4.1. *Mediul de întreținere a sușei și de bază a dozării [b]*

Peptonă de carne	6,0 g
Tripton	4,0 g
Extras de drojdie	3,0 g
Extras de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g
Geloză	10,0 la 20,0 g
Apă	1 000 ml
pH 6,5 (după sterilizare)	

4.2. *Tampon fosfat, pH 6*

Fosfat bipotasic, K_2HPO_4	2,0 g
Fosfat monopotasic, KH_2PO_4	8,0 g
Apă până la	1 000 ml

4.3. Soluție de 0,8 % (p/v) de clorură de sodiu: se dizolvă în apă 8 g de clorură de sodiu, se diluează până la 1 000 ml și se sterilizează.

4.4. Metanol.

4.5. Amestec de tampon fosfat (4.2) și de metanol (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Soluție metanolică de 0,5 % (p/v) Tween 80: se dizolvă 5 g de Tween 80 în metanol (4.4) și se diluează până la 1 000 ml cu metanol.

4.7. Substanță etalon: virginiamicină cu activitate cunoscută.

5. **Soluții etalon**

Se dizolvă o cantitate cântărită cu exactitate din substanța etalon (4.7) în metanol (4.4) și se diluează cu metanol (4.4) pentru a se obține o soluție-mamă de 1 000 µg de virginiamicină/ml.

Păstrată în flacon închis la 4 °C, soluția este stabilă timp de cinci zile.

Folosind această soluție, prin diluții succesive cu ajutorul amestecului (4.5), se pregătesc soluțiile următoare:

s8	1	µg/ml
s_4	0,5	µg/ml
s_2	0,25	µg/ml
s_1	0,125	µg/ml

6. **Pregătirea extrasului și a soluțiilor**

6.1. *Extragerea*

6.1.1. Produse al căror conținut de virginiamicină nu depășește 100 mg/kg

Se cântărește o cantitate de probă de 50 g. Se adaugă 200 ml de soluție (4.6), se agită timp de 30 de minute, apoi se lasă pentru depunere sau se centrifughează. Se iau 20 ml de soluție supranatantă și se evaporă până la 5 ml într-un evaporator rotativ la o temperatură de maximum 40 °C. Se diluează reziduul cu ajutorul amestecului (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de virginiamicină de 1 µg/ml (= u_8).

6.1.2. Produse al căror conținut de virginiamicină depășește 100 mg/kg

Se cântărește o cantitate de eșantion de maximum 10,0 g cu un conținut de 1 la 50 mg de virginiamicină. Se adaugă 100 ml de soluție (4.6), se agită timp de 30 de minute, apoi se lasă pentru depunere sau se centrifughează. Se diluează soluția supranatantă cu ajutorul amestecului (4.5) pentru a se obține o concentrație de virginiamicină de 1 µg/ml (= u_8).

6.2. *Soluțiile de extras*

Folosind soluția u_8 și, prin diluții succesive (1 + 1) cu ajutorul amestecului (4.5) se prepară soluțiile u_4 (concentrația preconizată: 0,5 µg/ml), u_2 (concentrația preconizată: 0,25 µg/ml) și u_1 (concentrația preconizată: 0,125 µg/ml).

7. **Metode de dozare**

7.1. *Inocularea mediului de cultură*

Se însămânțează la aproximativ 50 °C mediul de bază de dozare (4.1) cu suspensia bacteriană (3.2). Prin încercări preliminare pe lamele cu mediul (4.1) se determină cantitatea de suspensie bacteriană care permite obținerea diferitelor concentrații de virginiamicină în zone de inhibiție cât mai întinse și deocamdată curate.

7.2. *Pregătirea cutiilor*

Difuzarea pe geloză se efectuează în cutii conținând cele patru concentrații de soluție etalon (s_8, s_4, s_2, s_1) și cu cele patru concentrații ale extrasului (u_8, u_4, u_2, u_1). Fiecare cutie trebuie să conțină cele patru concentrații ale etalonului, respectiv ale extrasului. În acest scop, se alege dimensiunea cutiilor astfel încât să se poată realiza în mediul de geloză cel puțin opt cavități de 10-13 mm diametru, al căror centru se află la o distanță de cel puțin 30 mm. Se pot utiliza drept cutii plăci de sticlă plane, având deasupra un inel de aluminiu sau de plastic și dimensiunile de 200 mm diametru, respectiv 20 mm înălțime.

Se introduce în cutii o cantitate de mediu (4.1) însămânțată conform indicațiilor de la punctul 7.1, care permite obținerea unui strat de aproximativ 2 mm grosime (60 ml pentru o cutie de 200 mm diametru). Se lasă să se solidifice, se operează cavitățile și se pun în ele volumele, măsurate cu exactitate, ale soluțiilor de etalon și de extras (0,10 la 0,15 ml pe cavitate, în funcție de diametru). Se fac cel puțin patru repetări cu fiecare concentrație, astfel încât fiecare determinare să facă obiectul unei evaluări pentru 32 de zone de inhibiție.

7.3. *Incubația*

Timp de 16-18 ore, cutiile pot fi incubate la 30 °C ± 2 °C.

8. **Evaluare**

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție cu o toleranță de 0,1 mm. Pentru fiecare concentrație, se înregistrează măsurătorile medii pe hârtie semilogaritmică făcând logaritmul concentrațiilor comparativ cu diametrele zonelor de inhibiție. Se trasează dreptele cele mai potrivite pentru soluția etalon și pentru extras, procedându-se în felul următor:

Se determină punctul optim pentru cel mai scăzut nivel al soluției etalon (SL) cu ajutorul formulei:

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

Se determină punctul optim pentru nivelul cel mai înalt al soluției etalon (SH) cu ajutorul formulei:

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

În același mod se determină punctele cele mai adecvate de extras pentru nivelul cel mai scăzut (UL) și nivelul cel mai înalt (UH) înlocuind s_1, s_2, s_4 și s_8 din formulele precedente cu u_1, u_2, u_4 și u_8.

Se înscriu valorile SL și SH în același grafic. Unind cele două puncte se obține dreapta cea mai potrivită pentru soluția etalon. Procedând în același fel pentru UL și UH se obține dreapta cea mai potrivită pentru extras.

În cazul în care nu există nici o interferență, dreptele ar trebui să fie paralele. În practică, sunt considerate paralele atunci când valorile (SH - SL) și (UH - UL) nu diferă cu mai mult de 10 % față de media lor.

În cazul în care dreptele nu sunt paralele, se poate elimina fie u_1 și s_1, fie u_8 și s_8. Valorile SL, SH, UL și UH, care permit obținerea dreptelor celor mai potrivite, se calculează în acest caz cu ajutorul formulelor următoare:

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

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

și a formulelor analoge pentru UL și UH. Utilizarea acestei alternative impune respectarea acelorași criterii de paralelism. Obținerea unui rezultat provenind de la trei niveluri se menționează pe buletinul de analiză.

Când dreptele sunt considerate paralele, se calculează logaritmul activității relative (log. A) cu ajutorul uneia din formulele care urmează, în funcție de numărul de niveluri (4 sau 3) folosite pentru evaluarea paralelismului.

Pentru 4 niveluri:

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

Pentru 3 niveluri:

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

sau

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

Activitatea extrasului de eșantion = activitatea etalonului corespunzător x A:

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

În cazul în care activitatea relativă se află în afara gamei de valori cuprinse între 0,5 și 2,0, se repetă determinarea făcându-se ajustări adecvate ale concentrațiilor de extras sau, eventual, a soluțiilor etalon. Când această activitate nu mai poate fi adusă în gama valorilor cerute, rezultatul trebuie considerat aproximativ și această indicație trebuie să fie notată în buletinul de analiză.

Când dreptele sunt considerate neparalele, se repetă determinarea. Dacă tot nu se ajunge la paralelism, determinarea se consideră nesatisfăcătoare.

Se exprimă rezultatul în miligrame de virginiamicină pe kilogram de aliment.

9. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă de același analist nu trebuie să depășească:

— 2 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de virginiamicină sub 10 mg/kg;
— 20 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut între 10 și 25 mg/kg;
— 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut între 25 și 50 mg/kg;
— 10 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut de peste 50 mg/kg.

(1) 1 mg de virginiamicină este echivalent cu 1 000 de unități «UK».
(a) Se pot utiliza și alte metode, în măsura în care se dovedește că acestea produc suspensii bacteriene analoge.
(b) Se poate utiliza orice mediu de cultură comercial cu o compoziție analogă și care dă aceleași rezultate."

ANEXA III

„1. **DOZAREA BACITRACINEI ZINC**

— prin difuzare pe geloză —

1. **Obiect și domeniu de activitate**

Metoda permite dozarea bacitracinei zinc în alimente și amestecuri primare. Limita inferioară a dozării este de 5 mg/kg (5 ppm) [1].

2. **Principiu**

Proba se extrage cu pH 2 printr-un amestec de metanol, apă și acid clorhidric și o soluție de sulfură de sodiu. Sulfura de sodiu permite precipitarea sărurilor de cupru solubile care pot interfera în determinare. Extrasul adus la pH 6,5 se concentrează (dacă este necesar) și se diluează. Activitatea sa antibiotică se determină prin măsurarea difuzării bacitracinei zinc într-un mediu gelozat, însămânțat cu *Micrococcus luteus (flavus)*. Difuzarea se observă prin formarea zonelor de inhibiție ale microorganismului. Diametrul acestor zone se consideră direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotic pentru gama de concentrații utilizate.

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

3.1. *Întreținerea sușei*

Se însămânțează mediul de cultură (4.1), în tuburi înclinate, cu *Micrococcus luteus (flavus)*. Se incubează timp de 24 de ore la 30 °C, se păstrează la frigider la aproximativ 4 °C și se însămânțează din nou o dată la două săptămâni.

3.2. *Pregătirea suspensiei bacteriene [a]*

Se recoltează germenii dintr-un tub de geloză (3.1) preparată recent, cu ajutorul a 2-3 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3). Se însămânțează cu această suspensie 250 ml din mediul de cultură (4.1) într-o fiolă Roux și se incubează timp de 18-20 de ore la 30 °C. Se recoltează germenii în 25 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3) și se omogenizează. Se diluează suspensia la 1/10 cu ajutorul soluției de clorură de sodiu (4.3). Transmisia luminoasă a suspensiei, măsurată la 650 nm la o grosime de 1 cm trebuie să fie, prin comparație cu soluția de clorură de sodiu, de aproximativ 75 %. Suspensia poate fi păstrată timp de o săptămână la aproximativ 4 °C.

4. **Medii de cultură și reactivi**

4.1. *Mediul de întreținere a sușei [b]*

Peptonă de carne	6,0 g
Tripton	4,0 g
Extras de drojdie	3,0 g
Extras de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g
Geloză	10,0-20,0 g
Apă	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (după sterilizare)	

4.2. *Mediul de bază al dozării [c]*

Tripton	10,0 g
Extras de drojdie	3,0 g
Extras de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g
Geloză	10,0-20,0 g
Tween 80	1 ml
Apă	1 000 ml
pH 6,5 (după sterilizare)	

4.3. Soluție de 0,8 % (p/v) clorură de sodiu: se dizolvă în apă 8 g de clorură de sodiu, se diluează până la 1 000 ml și se sterilizează.

4.4. Amestec de metanol/apă/acid clorhidric (4.6):

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

4.5. *Tampon fosfat, pH 6,5:*

Fosfat bipotasic, K_2HPO_4	22,15 g
Fosfat monopotasic, KH_2PO_4	27,85 g
Apă până la	1 000 ml.

4.6. Acid clorhidric (d: 1,18-1,19).

4.7. Acid clorhidric (0,1 M).

4.8. Soluție 1 M de hidroxid de sodiu.

4.9. Soluție de aproximativ 0,5 M de sulfură de sodiu.

4.10. Soluție de 0,04 % (p/v) de roșu de bromocresol: se dizolvă 0,1 g de roșu de bromocresol în 18,5 ml de soluție 0,01 M de hidroxid de sodiu. Se completează până la 250 ml cu apă și se omogenizează.

4.11. Substanța etalon: bacitracina zinc cu activitate cunoscută (în UI).

5. **Soluții etalon**

Se cântărește o cantitate de substanță etalon (4.11) echivalentă cu 1 050 UL (în conformitate cu titlul indicat). Se adaugă 5 ml de acid clorhidric 0,1 M (4.7) și se lasă în repaus 15 minute. Se adaugă 30 ml apă, se ajustează pH-ul la 4,5 cu ajutorul tamponului fosfat (4.5) (aproximativ 4 ml), se completează până la 50 ml cu apă și se omogenizează (1ml = 21 UI).

Pornind de la această soluție, se prepară soluțiile următoare, prin diluții succesive cu ajutorul unui tampon fosfat (4.5):

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

6. **Prepararea extrasului**

6.1. *Extragerea*

6.1.1. Amestecuri primare și alimente minerale

Se cântărește o cantitate de eșantion de 2,0 până la 5,0 g, se adaugă 29,0 ml de amestec (4.4) și 1,0 ml de soluție de sulfură de sodiu (4.9); se agită scurt. Se verifică pH-ul care trebuie să fie de aproximativ 2. Se agită timp de zece minute, se adaugă 30 ml de tampon fosfat (4.5), se agită timp de 15 minute și se centrifughează. Se scoate o parte alicotă din soluția supranatantă și se aduce pH-ul la 6,5 cu ajutorul soluției 1 M de hidroxid de sodiu (4.8) folosind un pH-metru sau soluția de roșu de bromcresol (4.10) ca indicator. Se diluează cu ajutorul unui tampon fosfat (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 0,42 UI/ml (= u_8).

6.1.2. Concentrate proteinice

Se cântărește o probă de 10,0 g, se adaugă 49,0 ml de amestec (4.4) și 1,0 ml de soluție de sulfură de sodiu (4.9); se agită scurt. Se verifică pH-ul care trebuie să fie de aproximativ 2. Se agită timp de zece minute, se adaugă 50 ml de tampon fosfat (4.5), se agită timp de 15 minute și se centrifughează. Se scoate o parte alicotă din soluția supranatantă și se aduce pH-ul la 6,5 cu ajutorul soluției 1 M de hidroxid de sodiu (4.8) folosind un pH-metru sau soluția de roșu de bromcresol (4.10) ca indicator. Se evaporează aproximativ jumătate din volum într-un evaporator rotativ la o temperatură care nu depășește 35 °C.

Se diluează cu ajutorul tamponului fosfat (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 0,42 UI/ml (= u_8).

6.1.3. Alte alimente

Se cântărește o probă de 10,0 g (20,0 g pentru o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 5 mg/kg). Se adaugă 24,0 ml de amestec (4.4) și 1,0 ml de soluție de sulfură de sodiu (4.9); se omogenizează timp de zece minute. Se adaugă 25 ml de tampon fosfat (4.5), se agită timp de 15 minute și se centrifughează. Se scot 20 ml din soluția supranatantă și se aduce pH-ul la 6,5 cu ajutorul soluției 1 M de hidroxid de sodiu (4.8) folosind un pH-metru sau soluția de roșu de bromcresol (4.10) ca indicator. Se evaporează până la aproximativ 4 ml într-un evaporator rotativ la o temperatură care nu depășește 35 °C. Se diluează reziduul cu ajutorul tamponului fosfat (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 0,42 UI/ml (= u_8).

6.2. *Soluțiile de extras*

Se prepară, pornind de la soluția u_8 prin diluții succesive (1 + 1) cu ajutorul unui tampon fosfat (4.5), soluțiile u_4 (concentrația preconizată: 0,21 UI/ml), u_2 (concentrația preconizată: 0,105 UI/ml) și u_1 (concentrația preconizată: 0, 0525 UI/ml).

7. **Metode de dozare**

7.1. *Inocularea în mediul de cultură*

Se însămânțează la aproximativ 50 °C mediul de bază de dozare (4.2) cu suspensia bacteriană (3.2). Prin încercări preliminare pe lamele cu mediul de cultură (4.2) se determină cantitatea de suspensie bacteriană care permite obținerea diferitelor concentrații de bacitracină zinc în zone de inhibiție cât mai întinse și deocamdată curate.

7.2. *Pregătirea cutiilor*

Difuzarea pe geloză se efectuează în cutii conținând cele patru concentrații de soluție etalon (s_8, s_4, s_2, s_1) și cu cele patru concentrații ale extrasului (u_8, u_4, u_2, u_1). Fiecare cutie trebuie să conțină cele patru concentrații ale etalonului, respectiv ale extrasului. În acest scop, se alege dimensiunea cutiilor astfel încât să se poată realiza în mediul de geloză cel puțin opt cavități de 10-13 mm diametru, al căror centru se află la o distanță de cel puțin 30 mm. Se pot utiliza drept cutii plăci de sticlă plane, având deasupra un inel de aluminiu sau de plastic și dimensiunile de 200 mm diametru, respectiv 20 mm înălțime.

Se introduce în cutii o cantitate de mediu (4.2) însămânțată conform indicațiilor de la 7.1, care permite obținerea unui strat de aproximativ 2 mm grosime (60 ml pentru o cutie de 200 mm diametru). Se lasă să se solidifice, se operează cavitățile și se pun în ele volumele, măsurate cu exactitate, ale soluțiilor de etalon și de extras (0,10 la 0,15 ml pe cavitate, în funcție de diametru). Se fac cel puțin patru repetări cu fiecare concentrație, astfel încât fiecare determinare să facă obiectul unei evaluări pentru 32 de zone de inhibiție.

7.3. *Incubația*

Timp de 16-18 ore, cutiile pot fi incubate la 30 °C ± 2 °C.

8. **Evaluare**

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție cu o toleranță de 0,1 mm. Pentru fiecare concentrație, se înregistrează măsurile medii pe hârtie semilogaritmică făcând logaritmul concentrațiilor în comparație cu diametrele zonelor de inhibiție. Se trasează dreptele cele mai potrivite pentru soluția etalon și pentru extras procedând în felul următor:

Se determină punctul optim pentru cel mai scăzut nivel al soluției etalon (SL) cu ajutorul formulei:

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

Se determină punctul optim pentru cel mai înalt nivel al soluției etalon (SH) cu ajutorul formulei:

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

În același mod se determină punctele cele mai adecvate de extras pentru nivelul cel mai scăzut (UL) și nivelul cel mai înalt (UH), înlocuind s_1, s_2, s_4 și s_8 din formulele precedente cu u_1, u_2, u_4 și u_8.

Se înscriu valorile SL și SH în același grafic. Unind cele două puncte se obține dreapta cea mai potrivită pentru soluția etalon. Procedând în același fel pentru UL și UH se obține dreapta cea mai potrivită pentru extras.

În cazul în care nu există nici o interferență, dreptele ar trebui să fie paralele. În practică, sunt considerate paralele atunci când (SH - SL) și (UH - UL) nu diferă cu mai mult de 10 % față de media lor.

În cazul în care dreptele nu sunt paralele, se pot elimina fie u_1 și s_1, fie u_8 și s_8. Valorile SL, SH, UL și UH care permit obținerea dreptelor celor mai potrivite se calculează în acest caz cu ajutorul formulelor următoare:

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

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

și a formulelor analoge pentru UL și UH. Utilizarea acestei alternative impune respectarea acelorași criterii de paralelism. Obținerea unui rezultat provenind de la trei niveluri se menționează pe buletinul de analiză.

Când dreptele sunt considerate paralele, se calculează logaritmul activității relative (log. A) cu ajutorul uneia din formulele care urmează, în funcție de numărul de niveluri (4 sau 3) folosite pentru evaluarea paralelismului.

Pentru 4 niveluri:

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

Pentru 3 niveluri:

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

sau

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

Activitatea extrasului de eșantion = activitatea etalonului corespunzător × A:

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

În cazul în care activitatea relativă se află în afara gamei de valori cuprinse între 0,5 și 2,0, se repetă determinarea făcându-se ajustări adecvate ale concentrațiilor de extras sau, eventual, ale soluțiilor etalon. Când această activitate nu mai poate fi adusă în gama valorilor cerute, rezultatul trebuie considerat aproximativ și această indicație trebuie să fie notată în buletinul de analiză.

Când dreptele sunt considerate neparalele, se repetă determinarea. Dacă tot nu se ajunge la paralelism, determinarea se consideră nesatisfăcătoare.

Se exprimă rezultatul în miligrame de bacitracină zinc pe kilogram de aliment.

9. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă de același analist nu trebuie să depășească:

— 2 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de bacitracină zinc sub 10 mg/kg;

— 20 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut între 10 și 25 mg/kg;

— 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut între 25 și 50 mg/kg:

— 10 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut de peste 50 mg/kg.

---

(1) 1 mg de bacitracină zinc (calitate pentru alimentele animalelor) este echivalent cu 42 unități internaționale (UI).
(a) Se pot utiliza și alte metode în măsura în care se dovedește că acestea produc suspensii bacteriene analoge.
(b) Se poate utiliza orice mediu de cultură comercial cu o compoziție analogă și care dă aceleași rezultate.
(c) Se poate utiliza orice mediu de cultură comercial cu o compoziție analogă și care dă aceleași rezultate."