

381L0715

N° L 257/38

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

10. 9. 81

NOVENA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 31 de julio de 1981

por la que se establecen métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales

(81/715/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales (*), modificada en último lugar por el Acta de adhesión de Grecia, y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva mencionada prevé que los controles oficiales de los alimentos para animales destinados a comprobar que se cumplen las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas relativas a la calidad y composición de los alimentos para animales se efectuarán de acuerdo con métodos de toma de muestras y métodos de análisis comunitarios;

Considerando que las Directivas de la Comisión 71/250/CEE (*), 71/393/CEE (*), 72/199/CEE (*), 73/46/CEE (*), 74/203/CEE (*), 75/84/CEE (*), 76/372/CEE (*) y 78/633/CEE (*), modificadas en último lugar por la Directiva de 30 de julio de 1981, han establecido ya determinados métodos de análisis comunitario; que, habida cuenta del estado de los trabajos efectuados desde entonces, es conveniente adoptar una novena serie de métodos;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán que los análisis previstos para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere a su contenido en avoparcina y en monensina sódica, se efectúen de acuerdo con los métodos descritos en el Anexo.

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva el 1 de diciembre de 1981 e informarán de ello a la Comisión.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 31 de julio de 1981.

*Por la Comisión**El Presidente*

Gaston THORN

(*) DO n° L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

(*) DO n° L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.

(*) DO n° L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

(*) DO n° L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

(*) DO n° L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.

(*) DO n° L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.

(*) DO n° L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.

(*) DO n° L 102 de 15. 4. 1976, p. 8.

(*) DO n° L 206 de 29. 7. 1978, p. 43.

ANEXO

1. DETERMINACIÓN DE AVOPARCINA POR DIFUSIÓN DE GELOSA

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método permite determinar la avoparcina en los alimentos y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 mg/kg (2ppm). La presencia de antibióticos polietéreos puede interferir en la determinación.

2. PRINCIPIO

La muestra se somete a una extracción con una mezcla de acetona/agua/ácido clorhídrico. La actividad antibiótica del extracto se determina midiendo la difusión de la avoparcina en un medio gelosado, sembrado con *Bacillus subtilis*. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de estas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración en antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

3. MICROORGANISMO: *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Mantenimiento de la cepa

Sembrar el medio de cultivo (4.1) en tubos inclinados, con *Bacillus subtilis*. Incubar durante una noche a 30 °C, conservar en un refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra todos los meses.

3.2. Preparación de la suspensión de esporas ⁽¹⁾

Recoger los gérmenes de un tubo de gelosa (3.1), de preparación reciente, con ayuda de 2 a 3 ml de agua esterilizada. Sembrar con esta suspensión 300 ml del medio de cultivo (4.1) en un frasco de Roux e incubar durante tres a cinco días a 30 °C. Después de controlar la esporulación al microscopio, recoger las esporas en 15 ml de etanol (4.2) y homogeneizar. Esta suspensión puede conservarse por lo menos cinco meses a 4 °C aproximadamente.

4. MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS

4.1. Medio de mantenimiento de la cepa ⁽²⁾

Peptona	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	15,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (después de la esterilización)	

4.2. Etanol al 20 % (v/v): diluir 200 ml de etanol en 800 ml de agua.

4.3. Acido clorhídrico, d: 1,18-1,19.

⁽¹⁾ Pueden utilizarse otros métodos en la medida en que esté probado que producen suspensiones de esporas análogas.

⁽²⁾ Puede utilizarse cualquier medio comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

- 4.4. Solución 2 M de hidróxido de sodio.
- 4.5. Tampón fosfato 0,1 M:
dihidrógenofosfato de potasio, KH_2PO_4 : 13,6 g
agua hasta 1 000 ml
ajustar el pH a 4,5.
- 4.6. Mezcla acetona/agua/ácido clorhídrico (4.3): 65/32,5/2,5 (v/v/v).
- 4.7. Sustancia patrón: sulfato de avoparcina de actividad conocida.

5. SOLUCIONES PATRÓN

Disolver una cantidad exactamente pesada de 10 mg aproximadamente de sustancia patrón (4,7) en el tampón fosfato (4,5) y diluirla con dicho tampón para obtener una solución madre de avoparcina en 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Conservada en un frasco cerrado a 4 °C, esta solución es estable durante siete días.

5.1. Para las premezclas

Preparar a partir de dicha solución y mediante diluciones consecutivas con el tampón fosfato (4,5) las soluciones siguientes:

- S_8 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 S_4 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 S_2 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 S_1 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.2. Para los alimentos

Preparar a partir de dicha solución y mediante diluciones consecutivas con el tampón fosfato (4,5) las soluciones siguientes:

- S_8 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 S_4 1,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 S_2 0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 S_1 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y DE LAS SOLUCIONES

6.1. Premezclas

Pesar, con una precisión de 10 mg, una cantidad de muestra que contenga de 10 a 100 mg de avoparcina aproximadamente, transvasarla a un matraz aforado de 100 ml, añadir 60 ml de la mezcla (4.6) y agitar durante 15 minutos en un agitador mecánico. Verificar el pH y ajustarlo a 2, si fuere necesario, con ácido clorhídrico (4.3). Completar hasta el volumen con la mezcla (4.6) y homogeneizar. Filtrar una parte en un papel filtro adecuado (por ej. Whatman n° 1) y eliminar los primeros 5 ml del filtrado. Tomar una parte alícuota y ajustar el pH a 4,5 con la solución de hidróxido de sodio (4.4). Diluir esta solución con el tampón de fosfato (4.5) para obtener una concentración supuesta en avoparcina de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (= U_8).

Preparar a partir de dicha solución y mediante diluciones sucesivas (1 + 1) con el tampón fosfato (4.5) las soluciones U_4 (concentración supuesta: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), U_2 (concentración supuesta: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y U_1 (concentración supuesta: 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6.2. Alimentos

Pesar una cantidad de muestra de 50,0 g, añadir 100 ml de la mezcla (4.6) y agitar durante 30 minutos en un agitador mecánico. Clarificar el extracto mediante centrifugación (en tubos cerrados), tomar una parte alícuota del extracto limpio (véase el cuadro que sigue) y ajustar el pH a 4,5 con la solución de hidróxido de sodio (4.4). Diluir esta solución con el tampón fosfato (4.5) para obtener la solución U_8 (véase el cuadro que sigue).

Preparar a partir de dicha solución y mediante diluciones sucesivas (1 + 1) con el tampón fosfato (4.5) las soluciones U_4 (concentración supuesta: 1,0 $\mu\text{g/ml}$), U_2 (concentración supuesta: 9,5 $\mu\text{g/ml}$) y U_1 (concentración supuesta: 0,25 $\mu\text{g/ml}$).

Contenido supuesto en avoparcina (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Peso de la muestra en g ($\pm 0,1$ g)	50	50	50	50	50	50
Volumen de la mezcla (4,6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Volumen del extracto límpido (ml)	20	15	20	15	20	10
Volumen final (ml): U_8	25	25	50	50	100	100
Concentración supuesta U_8 en $\mu\text{g/ml}$	2	env. 2	2	env. 2	2	2

7. MODALIDADES DE DETERMINACIÓN

7.1. Inoculación del medio de cultivo

Sembrar a 50-60 °C el medio de base de la determinación (4.1) con la suspensión de esporas (3.2). Mediante ensayos preliminares en placas con el medio (4.1), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener, para las distintas concentraciones en avoparcina, zonas de inhibición lo más extensas posibles y que además sean nítidas.

7.2. Preparación de las cajas

La difusión en gelosa se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones del patrón y del extracto. A tal fin, elegir la dimensión de las cajas de forma que se puedan practicar en el medio gelosado por lo menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten entre sí menos de 30 mm. Se pueden utilizar como cajas placas de vidrio planas, coronadas con un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cajas una cantidad del medio (4.1), sembrado como se indica en 7.1, que permita obtener una capa de 2 mm de grosor aproximadamente (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, practicar las cavidades y depositar en las mismas los volúmenes exactamente medidos de la solución patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro). Hacer por lo menos cuatro repeticiones de cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

7.3. Incubación

Incubar las cajas durante 16 a 18 horas a 30 °C.

8. EVALUACIÓN

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una precisión de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico trazando el logaritmo de las concentraciones frente a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para el extracto procedente de la misma, por ejemplo de la forma siguiente:

Determinar el punto más adecuado del nivel más bajo de la solución patrón (SL) mediante la fórmula:

$$(a) \text{ SL} = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinar el punto más adecuado del nivel más alto de la solución patrón (SH) mediante la fórmula:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinar de la misma forma los puntos más adecuados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH) sustituyendo S_1, S_2, S_4 y S_8 en las fórmulas anteriormente mencionadas por U_1, U_2, U_4 y U_8 .

Inscribir los valores SL y SH en el mismo gráfico. Uniendo los dos puntos se obtiene la recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo de la misma forma para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

A falta de toda interferencia, las rectas deben ser paralelas. En la práctica, se consideran paralelas cuando (SH-SL) y (UH-UL) no difieren en más de 10 % de su media.

Si las rectas no fueren paralelas, puede eliminarse o bien U_1 y S_1 , o bien U_8 y S_8 . Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces las fórmulas siguientes:

$$(a) \text{ SL} = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b) \text{ SH} = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

y fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa debe ser objeto asimismo de verificación en lo que se refiere al paralelismo de las rectas, tal como se ha indicado. En el boletín de análisis deberá mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante una de las fórmulas siguientes.

Para cuatro niveles

$$(c) \text{ Log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Para tres niveles

$$(d) \text{ Log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

o

$$(d') \text{ Log. A} = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Actividad real = actividad supuesta \times actividad supuesta \times actividad relativa.

Si la actividad relativa se encuentra fuera de la gama de valores comprendida entre 0,5 y 2,0, repetir la determinación procediendo a los ajustes adecuados de las concentraciones de extracto o, en su caso, de las soluciones patrón. Cuando dicha actividad no pueda restablecerse en la gama de valores requeridos, el resultado se considerará aproximado y esta indicación deberá anotarse en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, repetir la determinación. Si no se lograra todavía el paralelismo, la determinación deberá considerarse no satisfactoria.

9. REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas en la misma muestra por el mismo analista no deberá exceder de:

- 2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos en avoparcina de 2 a 10 mg/kg,
- un 20 % del resultado más alto para los contenidos de 10 a 25 mg/kg,
- 5 mg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg,
- un 10 % del resultado más alto para los contenidos superiores a 50 mg/kg.

2. DETERMINACIÓN DE LA MONENSINA SÓDICA — POR DIFUSIÓN DE GELOSA

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método permite determinar la monensina sódica en los alimentos y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCIPIO

La muestra se somete a extracción con metanol al 90 %. El extracto se somete a tratamientos adecuados según el contenido en monensina sódica de la muestra. Su actividad antibiótica se determina midiendo la difusión de la monensina sódica en un medio gelosado, sembrado con *Bacillus subtilis*. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de estas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración en antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas. La sensibilidad de este proceso se reduce en presencia de iones sodio.

3. MICROORGANISMO: *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Mantenimiento de la cepa

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con *Bacillus subtilis*. Incubar durante una noche a 30 °C, conservar en un refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra todos los meses.

3.2. Preparación de la suspensión de esporas ⁽²⁾

Recoger los gérmenes de un tubo de gelosa (3.1), de preparación reciente, con ayuda de 2 a 3 ml de agua esterilizada. Sembrar con esta suspensión 300 ml del medio de cultivo (4.1) en un frasco de Roux e incubar durante tres a cinco días a 30 °C. Después de controlar la esporulación al microscopio, recoger las esporas en 15 ml de etanol (4.3) y homogeneizar. Esta suspensión puede conservarse por lo menos cinco meses a 4 °C aproximadamente.

4. MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS

4.1. Medio de mantenimiento de la cepa ⁽³⁾

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa (según la calidad)	10,0 a 20,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (después de la esterilización)	

4.2. Medio de base de la detrmnación

Glucosa	10,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Hidrogenofosfato de potasio, K ₂ HPO ₄	0,69 g
Dihidrogenofosfato de potasio, KH ₂ PO ₄	0,45 g
Gelosa (según la calidad)	10,0 a 20,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,0 (después de la esterilización).	

⁽¹⁾ 1 mg de monensina sódica equivale a 1 000 unidades «UK»

⁽²⁾ Pueden utilizarse otros métodos en la medida en que esté probado que producen suspensiones de esporas análogas.

⁽³⁾ Puede utilizarse cualquier medio comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

- 4.3. Etanol al 20 % (v/v): diluir 200 ml de etanol en 800 ml de agua.
- 4.4. Metanol, anhidro.
- 4.5. Metanol al 90 % (v/v): diluir 900 ml de metanol (4.4) en 100 ml de agua.
- 4.6. Metanol al 50 % (v/v): diluir 500 ml de metanol (4.4) en 500 ml de agua.
- 4.7. Óxido de aluminio granulado (Alcoa F, 20 mesh: Activated Alumina UG1: F. Lancaster and Co., o equivalente).
- 4.8. Sustancia patrón: monensina sódica de actividad conocida (disponible en particular en el Internacional Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, Gran Bretaña).

5. EQUIPO

- 5.1. Aparato rotatorio de evaporación al vacío, con matraz de fondo redondo de 250 ml.
- 5.2. Tubo para cromatografía, de vidrio, diámetro interior: 25 mm, longitud: 400 mm, con una abertura aguzada de 2 mm de diámetro en un extremo.
- 5.3. Tubo para cromatografía, de vidrio, diámetro interior: 11 mm, longitud: 300 mm aproximadamente, con una abertura aguzada de 2 mm de diámetro en un extremo.

6. SOLUCIONES PATRÓN

Disolver una cantidad exactamente pesada de sustancia patrón (4.8) en metanol (4.4) y diluir para obtener una solución madre de monensina sódica a 800 µg. Conservada en un frasco cerrado a 4 °C, esta solución es estable durante dos semanas.

Preparar, a partir de dicha solución y mediante diluciones sucesivas con metanol al 50 % (4.6), las soluciones siguientes:

- S₈ 8 µg/ml
- S₄ 4 µg/ml
- S₂ 2 µg/ml
- S₁ 1 µg/ml.

7. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

7.1. Extracción

7.1.1. Premezclas

Pesar una cantidad de muestra de 2,0 g, añadir 100 ml de metanol al 90 % (4.5), homogeneizar y a continuación centrifugar durante algunos minutos. Diluir la solución sobrenadante con metanol al 50 % (4.6) para obtener una concentración supuesta en monensina sódica de 8 µg/ml (= U₈).

7.1.2. Alimentos cuyo contenido en monensina sódica no sea inferior a 50 ppm

Pesar una cantidad de muestra de 10,0 a 20,0 g, añadir 100 ml de metanol al 90 % (4.5), homogeneizar durante 15 minutos y dejar reposar.

Introducir una torunda de algodón en la abertura aguzada del tubo de vidrio (5.2), añadir óxido de aluminio (4.7), sacudiendo ligeramente el tubo, hasta que la columna alcance 75 a 80 mm de altura.

Decantar el extracto de la columna de óxido de aluminio y recoger el filtrado. Diluir 30 ml del filtrado en 50 ml de agua. A continuación diluir con metanol al 50 % (4.6) para obtener una concentración supuesta en monensina sódica de 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3. Alimentos cuyo contenido en monensina sódica sea inferior a 50 ppm (hasta el límite de 10 ppm)

Pesar una cantidad de muestra de 10,0 a 20,0 g, añadir 100 ml de metanol al 90 % (4.5) y homogeneizar durante 15 minutos. Centrifugar para obtener un extracto límpido.

Tomar 40 ml del líquido sobrenadante para una muestra cuyo contenido en monensina sea de 20 ppm; 80 ml para una muestra cuyo contenido sea de 10 ppm. Evaporar en seco al vacío en un aparato rotatorio (5.1) a una temperatura que no exceda de 40 °C. Disolver el residuo en 10 ml de metanol al 90 % (4.5).

Introducir una torunda de algodón en la abertura aguzada de un tubo de vidrio (5.3), añadir óxido de aluminio (4.7), sacudiendo ligeramente el tubo, hasta que la columna alcance 75 a 80 mm de altura.

Decantar la solución metanólica del residuo de la columna de óxido de aluminio y recoger el filtrado. Lavar la columna con 10 ml de metanol al 90 % (4.5) y añadir el agua del aclarado al filtrado.

Evaporar la solución en seco al vacío en el aparato rotatorio (5.1) a una temperatura inferior a 40 °C. Disolver el residuo en 10 ml de metanol anhidro (4.4) y completar hasta 20 ml con agua. Centrifugar a 4 000 rpm por lo menos durante 5 minutos. A continuación diluir con metanol al 50 % (4.6) para obtener una concentración supuesta en monensina sódica de 8 µg/ml (= U₈).

7.2. Soluciones del extracto

Preparar, a partir de la solución U₈ y mediante diluciones sucesivas (1 + 1) con metanol al 50 % (4.6), las soluciones U₄ (concentración supuesta: 4 µg/ml), U₂ (concentración supuesta: 2 µg/ml) y U₁ (concentración supuesta: 1 µg/ml).

8. MODALIDADES DE DETERMINACIÓN

8.1. Inoculación del medio de cultivo

Sembrar a 50-60 °C el medio de base de la determinación (4.2) con la suspensión de esporas (3.2). Mediante ensayos preliminares en placas con el medio (4.2), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener, para las distintas concentraciones en monensina sódica, zonas de inhibición lo más extensas posible y que además sean nítidas.

8.2. Preparación de las cajas

La difusión se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de la solución patrón (S₈, S₄, S₂, S₁) y las cuatro concentraciones del extracto (U₈, U₄, U₂, U₁). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones del patrón y del extracto. A tal fin, elegir la dimensión de las cajas de tal forma que se puedan practicar en el medio gelosado por lo menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten entre sí menos de 30 mm. Se pueden utilizar como cajas placas de vidrio planas, coronadas con un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cajas una cantidad del medio (4.2), sembrado como se indica en 8.1, que permita obtener una capa de 2 mm de grosor aproximadamente (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, practicar las cavidades y depositar en las mismas los volúmenes exactamente medidos de la solución patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro). Hacer por lo menos cuatro repeticiones de cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

8.3. Incubación

Incubar las cajas durante 18 horas aproximadamente a 35-37 °C.

9. EVALUACIÓN

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una precisión de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico trazando el logaritmo de las concentraciones frente a los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para el extracto procedente de la misma, por ejemplo, de la forma siguiente.

Determinar el punto más adecuado del nivel más bajo de la solución patrón (SL) mediante la fórmula:

$$(a) SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinar el punto más adecuado del nivel más alto de la solución patrón (SH) mediante la fórmula:

$$(b) SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinar de la misma forma los puntos más adecuados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH), sustituyendo S_1 , S_2 , S_4 y S_8 en las fórmulas anteriormente mencionadas por U_1 , U_2 , U_4 y U_8 .

Inscribir los valores SL y SH en el mismo gráfico. Uniendo los dos puntos se obtiene la recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo de la misma forma para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

A falta de toda interferencia, las rectas deben ser paralelas. En la práctica, se consideran paralelas cuando (SH—SL) y (UH—UL) no difieren en más del 10 % de su media.

Si las rectas no fueren paralelas, puede eliminarse o bien U_1 y S_1 , o bien U_8 y S_8 . Los valores SL, SH, UL y UH que permitan obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces mediante las fórmulas siguientes:

$$(a) SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b) SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

y fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa debe ser objeto asimismo de una verificación en lo que se refiere al paralelismo de las rectas, tal como se ha indicado. En el boletín de análisis debe mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) con una de las fórmulas siguientes.

Para cuatro niveles

$$(c) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Para tres niveles

$$(d) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}, \text{ o}$$

$$(d) \log. A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Actividad real = actividad supuesta \times actividad relativa.

Si la actividad relativa se encuentra fuera de la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, repetir la determinación precediendo a los ajustes adecuados de las concentraciones de extracto o, en su caso, de las soluciones patrón. Cuando dicha actividad no pueda restablecerse en la gama de valores requeridos, el resultado se considerará aproximado y esta indicación deberá anotarse en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, repetir la determinación. Si no se lograra todavía el paralelismo, la determinación deberá considerarse no satisfactoria.

10. REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas en la misma muestra por el mismo analista no deberá exceder de:

- un 20 % del resultado más alto para los contenidos en monensina sódica de 10 a 25 mg/kg,
- 5 mg/kg en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg,
- un 10 % del resultado más alto para los contenidos superiores a 50 mg/kg.