

384L0004

N° L 15/28

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

18. 1. 84

DIRECTIVA DE LA COMISIÓN**de 20 de diciembre de 1983**

por la que se modifican las Directivas 71/393/CEE, 72/199/CEE y 78/633/CEE por las que se establecen métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales

(84/4/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 modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽¹⁾, modificada en último lugar por el Acta de adhesión de Grecia, y, en particular, su artículo 2,

Considerando que las Directivas 71/393/CEE ⁽²⁾, 72/199/CEE ⁽³⁾ y 78/633/CEE ⁽⁴⁾ de la Comisión establecen, respectivamente, los métodos de determinación de las materias grasas brutas, de la virginiamicina y de la bacitracina-cinc; que resulta necesario sustituir dichos métodos por otros adaptados a la evolución de los conocimientos científicos y técnicos;

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

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

En el Anexo de la Directiva 71/393/CEE, se sustituye el texto de la Parte 4, «Determinación de las materias grasas brutas», por el que figura en el Anexo I de la presente Directiva.

Artículo 2

En el Anexo II de la Directiva 72/199/CEE, se sustituye el texto de la Parte 5 «Determinación de la virginiamicina: por difusión en gelosa», por el que figura en el Anexo II de la presente Directiva.

Artículo 3

En el Anexo de la Directiva 78/633/CEE, se sustituye el texto de la Parte 1, «Determinación de la bacitracina-cinc: por difusión en gelosa», por el que figura en el Anexo III de la presente Directiva.

Artículo 4

Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva, a más tardar el 1 de junio de 1984 e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 5

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 20 de diciembre de 1983.

Por la Comisión

Poul DALSGER

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO n° L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

⁽²⁾ DO n° L 279 de 20. 12. 1972, p. 7.

⁽³⁾ DO n° L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

⁽⁴⁾ DO n° L 206 de 29. 7. 1978, p. 43.

ANEXO I

«4. DETERMINACIÓN DE LAS MATERIAS GRASAS BRUTAS

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

El método permite determinar el contenido de materias grasas brutas de los alimentos para animales. No es válido para el análisis de las semillas y frutos oleaginosos definidos en el Reglamento (CEE) n° 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966.

Según la naturaleza del alimento, debe aplicarse uno u otro de los procedimientos descritos a continuación.

1.1. *Procedimiento A*

Aplicable a los alimentos simples de origen vegetal, con excepción de los que se sabe que contienen materias grasas que no pueden extraerse completamente mediante el éter de petróleo sin hidrólisis previa. En estas excepciones se incluyen los glútenes, la levaduras, las proteínas de soja y de patatas. El procedimiento es aplicable asimismo a los piensos compuestos, con excepción de los que contengan leche en polvo o cuyas materias grasas no puedan extraerse completamente mediante el éter de petróleo sin hidrólisis previa.

1.2. *Procedimiento B*

Aplicable a los alimentos simples de origen animal, así como a los alimentos mencionados en el punto 1.1 como excepciones para la aplicación del procedimiento A.

2. **Principio**2.1. *Procedimiento A*

Se extrae la muestra por medio de éter de petróleo. Se destila el disolvente, y se seca y pesa el residuo.

2.2. *Procedimiento B*

Se trata la muestra en caliente mediante ácido clorhídrico. Se enfría y filtra la mezcla. Después de lavarlo y secarlo, el residuo se somete al análisis según el procedimiento A.

3. **Reactivos**

3.1. Éter de petróleo, intervalo de ebullición: 40 a 60 °C. El índice de bromo debe ser inferior a 1 y el residuo de evaporación inferior a 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfato de sodio, anhidro.

3.3. Acido clorhídrico 3 N.

3.4. Coadyudante de filtración, como por ejemplo tierra de diatomeas, Hiflo-supercel.

4. **Aparatos**

4.1. Extractor. Si el aparato está provisto de un sifón (aparato Soxhlet), el caudal de reflujo debe regularse de forma que se obtengan por 10 menos 10 ciclos por hora. Si se trata de un aparato sin sifón, el caudal líquido refluído debe ser de alrededor de 10 ml por minuto.

4.2. Cartuchos de extracción, exentos de sustancias solubles en el éter de petróleo, cuya porosidad sea compatible con las exigencias del punto 4.1.

4.3. Estufa de secado, bien por vacío a 75 °C ± 3 °C, bien a presión atmosférica a 100 °C ± 3 °C.

5. **Modo de operación**5.1. *Procedimiento A* (véase observación 8.1)

Pesar, con error no superior a 1 mg, 5 g de muestra, introducirlos en un cartucho de extracción (4.2) y cubrirlos con una torunda de algodón desgrasado.

Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y extraer durante seis horas por medio de éter de petróleo (3.1). Recoger en un matraz seco provisto de piedra pómez (1) y tarado.

Eliminar el disolvente por destilación. Secar el residuo mediante colocación del matraz durante una hora y media en una estufa de secado (4.3). Dejar enfriar en un secador y pesar. Secar de nuevo durante treinta minutos para asegurarse de que el peso de la materia grasa se mantiene constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior a 1 mg).

(1) Sustituir los fragmentos de piedra pómez por perlas de vidrio cuando la materia grasa deba someterse a exámenes cualitativos ulteriores.

5.2. **Procedimiento B**

Pesar, con error inferior a 1 mg, 2,5 g de la muestra (ver observación 8.2), introducirlos en un cilindro de 400 ml o en un matraz cónico de 300 ml y añadir 100 ml de ácido clorhídrico 3 N (33) y algunos fragmentos de piedra pómez. Cubrir el cilindro con un vidrio de reloj o dotar al matraz cónico de un refrigerador de reflujo. Llevar la mezcla a ebullición suave con ayuda de una llama pequeña o de una placa eléctrica, y mantenerla así durante una hora. Evitar que el producto se pegue a las paredes del recipiente.

Enfriar y añadir una cantidad de coadyudante de filtración (3.4) suficiente para evitar cualquier pérdida de materia grasa en el momento de la filtración. Filtrar en un papel filtro doble humedecido, exento de materias grasas. Lavar el residuo con agua fría hasta la neutralidad del filtrado. Comprobar que el filtrado no contiene materias grasas. La presencia de éstas indica que debe efectuarse una extracción, de la muestra mediante éter de petróleo, según el procedimiento A, antes de la hidrólisis.

Colocar el papel filtro doble que contiene el residuo en un vidrio de reloj, y secar durante una hora y media en la estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Introducir el papel filtro doble que contiene el residuo seco en un cartucho de extracción (4.2) y cubrirlo con una torunda de algodón desgrasado. Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y continuar la operación tal como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

6. **Cálculo de los resultados**

Expresar el resultado de la pesada en partes por ciento de muestra.

7. **Reproducibilidad**

La diferencia entre dos determinaciones paralelas efectuadas en una misma muestra mediante el mismo análisis no debe superar:

0,2 % en valor absoluto, para los contenidos de materias grasas brutas inferiores al 5 %,

4,0 % del resultado más elevado para los contenidos del 5 al 10 %,

0,4 % en valor absoluto, para los contenidos superiores al 10 %.

8. **Observaciones**

- 8.1. Para los productos con alto contenido de materias grasas, difíciles de desleír o no apropiados para la obtención de una muestra de ensayo reducida homogénea, ha de procederse del modo siguiente.

Pesar, con un error inferior a 1 mg, 20 g de la muestra y mezclarlos con 10 g o más de sulfato de sodio anhidro (3.2). Extraer mediante éter de petróleo (3.1) tal como se indica en el punto 5.1. Completar el extracto obtenido hasta 500 ml con éter de petróleo (3.1) y homogeneizarlo. Introducir 50 ml de la solución en un matraz pequeño seco, provisto de algunos fragmentos de piedra pómez (*) y tarado. Eliminar el disolvente por destilación, secar y continuar la operación tal como se indica en el último párrafo del punto 5.1.

Eliminar el disolvente del residuo de extracción presente en el cartucho, reducir el residuo a una finura de 1 mm, colocarlo de nuevo en el cartucho (no añadir sulfato de sodio) y continuar la operación tal como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

El contenido de materias grasas brutas en partes por ciento de muestras se determina mediante la fórmula:

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

en la que:

a = masa, en gramos, del residuo de la primera extracción (parte alicuota del extracto),

b = masa, en gramos, del residuo de la segunda extracción.

- 8.2. La cantidad para ensayo de los productos probres en materias grasas puede aumentarse a 5 g.*

(*) Sustituir los fragmentos de piedra pómez por perlas de vidrio cuando la materia gras deba someterse a exámenes cualitativos ulteriores.

ANEXO II

«5. DETERMINACIÓN DE LA VIRGINIAMICINA

— por difusión en gelosa —

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite determinar la virginiamicina en los alimentos y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 mg/kg (2 ppm) (1).

2. Principio

Se somete la muestra a una extracción mediante una solución metanólica de Tween 80. El extracto se decanta o centrifuga, y se diluye después. Su actividad antibiótica se determina por medición de la difusión de la virginiamicina en un medio de gelosa, sembrado con *Micrococcus luteus*. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

3. Microorganismos: «*Micrococcus luteus*» ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Mantenimiento de la cepa

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con *Micrococcus luteus*. Incubar durante veinticuatro horas a 30 °C, conservar en frigorífico a unos 4 °C y renovar la siembra cada quince días.

3.2. Preparación de la suspensión bacteriana (a)

Recoger los gérmenes en un tubo de gelosa (3.1), de preparación reciente, con ayuda de 2 a 3 ml de solución de cloruro sódico (4.3). Sembrar con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (4.1) en un matraz de Roux e incubar durante dieciocho a veinte horas a 30 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml. de solución de cloruro sódico (4.3) y homogeneizar.

Diluir la suspensión a $\frac{1}{10}$ con ayuda de la solución de cloruro sódico (4.3). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro sódico (4.3), debe ser de alrededor del 75 %. Esta suspensión puede conservarse una semana a unos 4 °C.

4. Medios de cultivo y reactivos

4.1. Medio de mantenimiento de la cepa y de base de la determinación (b)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	10,0 a 20,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (tras esterilización)	

4.2. Tampón fosfato, pH 6

Hidrogenofosfato de potasio K_2HPO_4	2,0 g
Dihidrogenofosfato de potasio, KH_2PO_4	8,0 g
Agua hasta	1 000 ml

4.3. Solución a 0,8 % (p/v) de cloruro sódico: disolver en agua 8 g de cloruro sódico, diluir hasta 1 000 ml y esterilizar.

4.4. Metanol.

4.5. Mezcla de tampón fosfato (4.2) y de metanol (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Solución en metanol al 0,5 % (p/v) de Tween 80: disolver 5 g de Tween 80 en metanol (4.4) y diluir hasta 1 000 ml con metanol.

4.7. Sustancia de referencia: virginiamicina de actividad conocida.

(1) 1 mg de virginiamicina equivale a 1 000 unidades «UK».

(a) Pueden utilizarse otros métodos, siempre que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.

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

5. Soluciones de referencia

Disolver una cantidad pesada exactamente de la sustancia de referencia (4.7) en el metanol (4.4) y diluir con metanol (4.4) para obtener una solución madre a 1 000 µg de virginiamicina/ml. Conservada en un matraz tapado a 4 °C, esta solución es estable durante 5 días.

Preparar, a partir de esta solución y mediante diluciones sucesivas con la ayuda de la mezcla (4.5), las soluciones siguientes:

S ₈	1	µg/ml
S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml

6. Preparación del extracto y de las soluciones

6.1. Extracción

6.1.1. Productos cuyo contenido en virginiamicina no excede de 100 mg/kg

Pesar una cantidad de muestra de 50,0 g. Añadir 200 ml de solución (4.6), agitar durante 30 minutos y dejar luego sedimentar o centrifugar. Recoger 20 ml de la solución sobrenadante y evaporar hasta 5 ml en un evaporador rotatorio a una temperatura que no exceda de 40 °C. Disolver el residuo con ayuda de la mezcla (4.5) para obtener una concentración supuesta de virginiamicina de 1 µg/ml (= U₈).

6.1.2. Productos cuyo contenido en virginiamicina es superior a 100 mg/kg

Pesar una cantidad de muestra que no exceda de 10,0 g y contenga de 1 a 50 mg de virginiamicina. Añadir 100 ml de solución (4.6), agitar durante 30 minutos, y dejar sedimentar luego o centrifugar. Disolver la solución sobrenadante con ayuda de la mezcla (4.5) para obtener una concentración de virginiamicina de 1 µg/ml (= U₈).

6.2. Soluciones del extracto

Preparar, a partir de la solución U₈ y por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la mezcla (4.5), las soluciones U₄ (concentración supuesta: 0,5 µg/ml, U₂ (concentración supuesta: 0,25 µg/ml) y U₁ (concentración supuesta: 0,125 µg/ml).

7. Modalidades de la determinación

7.1. Inoculación del medio de cultivo

Sembrar a unos 50 °C el medio de base de la determinación (4.1) con la suspensión bacteriana (3.2). Mediante ensayos preliminares sobre placas con el medio (4.1), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permite obtener para las diferentes concentraciones de virginiamicina zonas de inhibición lo más amplias posibles sin dejar de ser nítidas.

7.2. Preparación de las cajas

La difusión en gelosa se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de la solución de referencia (S₈, S₄, S₂, S₁) y las cuatro concentraciones del extracto (U₈, U₄, U₂, U₁). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones de la referencia y del extracto. A tal fin, hay que elegir la dimensión de las cajas de forma que se puedan excavar en el medio de gelosa por lo menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten menos de 30 mm. Pueden emplearse como cajas placas de vidrio planas, coronadas por 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 tal como se indica en 7.1, que permita obtener una capa de unos 2 mm de grosor (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, excavar las cavidades y depositar en ellas volúmenes exactamente medidos de las soluciones de la referencia y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad según el diámetro). Repetir por lo menos cuatro veces cada concentración, de forma que cada determinación comprenda la valoración de 32 zonas de inhibición.

7.3. Incubación

Incubar las cajas durante dieciséis a dieciocho horas a 30 °C ± 2 °C.

8. Valoración

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con un error no superior a 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico, trasladando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución de referencia y para el extracto, por ejemplo, mediante el procedimiento siguiente:

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución de referencia (SL) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución de referencia (SH) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar del mismo modo los puntos más apropiados 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 anteriores por U_1, U_2, U_4 y U_8 .

Consignar los valores SL y SH en la misma gráfica. Al unir los dos puntos, se obtiene la recta más ajustada para la solución de referencia. Si se sigue el mismo método para UL y UH, se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

Si no hubiere ninguna interferencia, las rectas se consideran paralelas cuando $(SH - SL)$ y $(UH - UL)$ no difieren en más de un 10 % de su media.

Si las rectas no son paralelas, pueden eliminarse U_1 y S_1 , o U_8 y S_8 . Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces con ayuda de la fórmulas siguientes:

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

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

y de fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a respetar los mismos criterios de paralelismo.

En el boletín de análisis debe mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, hay que calcular el logaritmo de la actividad relativa (log A) mediante una de las fórmulas siguientes, según el número de niveles (4 o 3) utilizados para la valoración del paralelismo.

Para 4 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 3 niveles:

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

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 del extracto de la muestra = actividad de la referencia correspondiente x A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Si la actividad relativa no se encuentra en la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, ha de repetirse la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, en su caso, de las soluciones de referencia. Cuando actividad no pueda encuadrarse en la gama de los valores exigidos, el resultado se considerará aproximado y así se hará constar en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, se repetirá la determinación. Si tampoco ahora se lograre el paralelismo, la determinación se considerará insatisfactoria.

Expresar el resultado en miligramos de virginiamicina por kilogramo de alimento.

9. Reproducibilidad

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

2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de virginiamicina inferiores a 10 mg/kg,

20 por 100 del resultado más alto, para los contenidos de 10 a 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg,

10 por 100 del resultado más alto, para los contenidos superiores a 50 mg/kg.»

ANEXO III

«1. DETERMINACIÓN DE LA BACITRACINA-CINC

— por difusión en gelosa —

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite determinar la bacitracina-cinc en los alimentos las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 5 mg/kg (5 ppm) ⁽¹⁾.

2. Principio

Se extrae la muestra a pH 2 mediante una mezcla de etanol, agua y ácido clorhídrico y una solución de sulfuro sódico. El sulfuro sódico permite precipitar las sales de cobre solubles que pudieran obstaculizar la determinación. El extracto, llevado a pH 6,5, se concentra (en caso necesario) y diluye. Su actividad antibiótica se determina por medición de la difusión de la bacitracina-cinc en un medio de gelosa, sembrado con *Micrococcus luteus (flavus)*. La difusión se manifiesta mediante la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

3. Microorganismo: «*Micrococcus luteus (flavus)*» ATCC 10240

3.1. Mantenimiento de la cepa

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con *Micrococcus luteus (flavus)*. Incubar durante veinticuatro horas a 30 °C, conservar en frigorífico a unos 4 °C y renovar la siembra cada quince días.

3.2. Preparación de la suspensión bacteriana (a)

Recoger los gérmenes de un tubo de gelosa (3.1), de preparación reciente, con la ayuda de 2 a 3 ml de solución de cloruro sódico (4.3). Sembrar con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (4.1) en un matraz de Roux e incubar durante dieciocho a veinte horas a 30 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml de solución de cloruro sódico (4.3) y homogeneizar.

Diluir la suspensión a 1/10 con ayuda de la solución de cloruro sódico (4.3). La transmisión luminosa de la solución, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro sódico (4.3), debe ser de alrededor del 75 %. Esta suspensión puede conservarse una semana a unos 4 °C.

4. Medios de cultivo y reactivos

4.1. Medio de mantenimiento de la cepa (b)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	10,0 a 20,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 — 6,6 (tras esterilización)	

4.2. Medio de base de la determinación (b)

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	10,0 a 20,0 g
Tween 80	1 ml
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (tras esterilización)	

4.3. Solución al 0,8 % (p/v) de cloruro sódico: disolver en agua 8 g de cloruro sódico, diluir a 1 000 ml y esterilizar.

4.4. Mezcla de metanol/agua/ácido clorhídrico (4.6): 80/17,5/2,5 (v/v/v).

⁽¹⁾ 1 mg de bacitracina-cinc (calidad para alimentos para animales) equivale a 42 unidades internacionales (UI).

(a) Pueden utilizarse otros métodos, siempre que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.

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

- 4.5. *Tampón fosfato, pH 6,5*
- | | |
|---------------------------------|----------|
| Fosfato bipotásico K_2HPO_4 | 22,15 g |
| Fosfato monopotásico KH_2PO_4 | 27,85 g |
| Agua hasta | 1 000 ml |
- 4.6. Ácido clorhídrico, d: 1,18-1,19
- 4.7. Ácido clorhídrico, 0,1 M
- 4.8. Solución 1 M de hidróxido sódico
- 4.9. Solución 0,5 M, aproximadamente, de sulfuro sódico
- 4.10. Solución al 0,04 % (p/v) de púrpura de bromocresol:
disolver 0,1 g de púrpura de bromocresol en 18,5 ml de solución 0,01 M de hidróxido sódico. Completar hasta 250 ml con agua y homogeneizar.
- 4.11. Sustancia de referencia: bacitracina-cinc de actividad conocida (en UI).

5. Soluciones de referencia

Pesar una cantidad de sustancia de referencia (4.11) correspondiente a 1 050 UI (según el título indicado). Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 M (4.7) y dejar reposar quince minutos. Añadir 30 ml de agua, ajustar el pH a 4,5 con la ayuda del tampón fosfato (4.5) (unos 4 ml), completar hasta 50 ml con agua y homogeneizar (1 ml = 21 UI).

Preparar, a partir de esta solución y mediante diluciones sucesivas con ayuda del tampón fosfato pH 6,5 (4.5), las soluciones siguientes:

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. Preparación del extracto

6.1. Extracción

6.1.1. Premezclas y alimentos minerales

Pesar una cantidad de mezcla de 2,0 a 5,0 g, añadir 29,0 ml de la mezcla (4.4) y 1,0 ml de solución de sulfuro sódico (4.9); agitar brevemente. Comprobar que el pH es de alrededor de 2. Agitar durante 10 minutos, añadir 30 ml de tampón fosfato (4.5), agitar durante 15 minutos y centrifugar. Tomar una parte alícuota de la solución sobrenadante y ajustar el pH a 6,5 con ayuda de la solución 1 M de hidróxido sódico (4.8) utilizando un pHmetro o la solución de púrpura de bromocresol como indicador.

Diluir con ayuda del tampón fosfato (4.5) para obtener una concentración supuesta en bacitracina-cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.2. Concentrados proteínicos

Pesar una cantidad de muestra de 10,0 g, añadir 49,0 ml de la mezcla (4.4) y 1,0 ml de la solución de sulfuro sódico (4.9); agitar brevemente. Comprobar que el pH es de alrededor de 2. Agitar durante 10 minutos, añadir 50 ml de tampón fosfato (4.5), agitar durante 15 minutos y centrifugar. Tomar una parte alícuota de la solución sobrenadante y ajustar el pH a 6,5 con ayuda de la solución 1 M de hidróxido sódico (4.8) utilizando un pHmetro o la solución de púrpura de bromocresol (4.10) como indicador.

Evaporar aproximadamente la mitad del volumen en un evaporador rotatorio a una temperatura que no exceda de 35 °C. Diluir con ayuda del tampón fosfato (4.5) para obtener una concentración supuesta en bacitracina-cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.3. Otros alimentos

Pesar una cantidad de muestra de 10 g (20,0 g para una concentración supuesta de bacitracina-cinc de 5 mg/kg). Añadir 24,0 ml de mezcla (4.4) y 1,0 ml de solución de sulfuro sódico (4.9); homogeneizar durante 10 minutos. Añadir 25 ml de tampón fosfato (4.5), agitar durante 15 minutos y centrifugar. Tomar 20 ml de la solución sobrenadante y ajustar el pH a 6,5 con ayuda de la solución 1 M de hidróxido sódico (4.8) utilizando un pHmetro o la solución de púrpura de bromocresol (4.10) como indicador. Evaporar hasta 4 ml aproximadamente en un evaporador rotatorio a una temperatura que no exceda de 35 °C. Diluir el residuo con ayuda del tampón fosfato (4.5) para obtener una concentración supuesta de bacitracina-cinc de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.2. Soluciones del extracto

Preparar, a partir de la solución U_8 y por diluciones sucesivas (1 + 1) con la ayuda del tampón fosfato (4.5), las soluciones U_4 (concentración supuesta: 0,21 UI/ml), U_2 (concentración supuesta: 0,105 UI/ml) y U_1 (concentración supuesta: 0,0525 UI/ml).

7. Modalidades de determinación

7.1. Inoculación del medio de cultivo

Sembrar a unos 50 °C el medio de base de la determinación (4.2) con la suspensión bacteriana (3.2) mediante ensayos preliminares en placas con el medio (4.2), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permite obtener para las diferentes concentraciones de bacitracina-cinc zonas de inhibición lo más amplias posibles sin dejar de ser nitidas.

7.2. Preparación de las cajas

La difusión en gelosa se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de la solución de referencia (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 de referencia y del extracto. A tal fin, hay que elegir la dimensión de las cajas de forma que se puedan excavar en el medio de gelosa por lo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten menos de 30 mm. Pueden emplearse como cajas placas de vidrio planas, coronadas por 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 tal como se indica en 7.1, que permita obtener una capa de unos 2 mm de grosor (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, excavar las cavidades y depositar en ellas volúmenes exactamente medidos de las soluciones de referencia y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad según el diámetro). Repetir por lo menos cuatro veces cada concentración, de forma que cada determinación comprenda la valoración de 32 zonas de inhibición.

7.3. Incubación

Incubar las cajas durante dieciséis a dieciocho horas a 30 °C ± 2 °C.

8. Valoración

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con un error no superior a 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico, trasladando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución de referencia y para el extracto, por ejemplo, mediante el procedimiento siguiente:

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución de referencia (SL) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución de referencia (H) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar del mismo modo los puntos más apropiados 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 anteriores por U_1, U_2, U_4 y U_8 .

Consignar los valores SL y SH en la misma gráfica. Al unir los dos puntos se obtiene la recta más ajustada para la solución de referencia. Si se sigue el mismo método para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

Si no hubiere ninguna interferencia, las rectas serían paralelas. En la práctica, se consideran paralelas cuando $(SH - SL)$ y $(UH - UL)$ no difieren en más de un 10 % de su media.

Si las rectas no son paralelas, pueden eliminarse U_1 y S_1 , o U_8 y S_8 . Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces con ayuda de las fórmulas siguientes:

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

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

y de fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a respetar los mismos criterios de paralelismo. En el boletín de análisis debe mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, hay que calcular el logaritmo de la actividad relativa (log A) mediante una de las fórmulas siguientes, según el número de niveles (4 o 3) utilizados para la valoración del paralelismo.

Para 4 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 3 niveles:

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

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

Actividad del extracto de la muestra = actividad de la referencia correspondiente \times A:

$$(U_k = S_k \times A)$$

Si la actividad relativa no se encuentra en la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, ha de repetirse la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, en su caso, de las soluciones de referencia. Cuando esta actividad no pueda encuadrarse en la gama de los valores exigidos, el resultado se considerará aproximado y así se hará constar en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, se repetirá la determinación. Si tampoco ahora se lograre el paralelismo, la determinación se considerará insatisfactoria.

Expresar el resultado en miligramos de bacitracina-cinc por kilogramo de alimento.

9. Reproducibilidad

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

2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de bacitracina-cinc inferiores a 19 mg/kg,

20 % del resultado más alto, para los contenidos de 10 a 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg,

10 % del resultado más alto, para los contenidos superiores a 50 mg/kg.*