384L0425

No L 238/34 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* 6.9.84

KYMMENES KOMISSION DIREKTIIVI,

annettu 25 päivänä heinäkuuta 1984,

yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten

(84/425/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin 70/373/ETY [1], sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Kreikan liittymisasiakirjalla, ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

edellä mainitussa direktiivissä säädetään rehujen virallisen tarkastuksen suorittamista yhteisön näytteenottoja määritysmenetelmiä käyttäen sen todentamiseksi, että lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten rehujen laatua ja koostumusta koskevat vaatimukset tulevat täytetyksi,

useita yhteisön määritysmenetelmiä on jo vahvistettu komission direktiiveillä 71/250/ETY [2], 73/46/ETY [3], 74/203/ETY [4], 75/84/ETY [5], 76/372/ETY [6], sellaisina kuin ne ovat viimeksi muutettuina direktiivillä 81/680/ETY [7], direktiiveillä 71/393/ETY [8], 72/199/ETY [9], 78/633/ETY [10], sellaisina kuin ne ovat viimeksi muutettuina direktiivillä 84/4/ETY [11], ja direktiivillä 81/715/ETY [12], työ on tämän jälkeen edistynyt siinä määrin, että olisi hyväksyttävä kymmenes ryhmä menetelmiä, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on vaadittava, että rehujen virallisessa tarkastuksessa käytettävät spiramysiinipitoisuusmääritykset suoritetaan tämän direktiivin liitteessä esitettyjen menetelmien mukaisesti.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 30 päivänä kesäkuuta 1985. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

3 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 25 päivänä heinäkuuta 1984.

Komission puolesta

Poul DALSAGER

Komission jäsen

---

(1) EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2
(2) EYVL N:o L 155, 12.7.1971, s. 13
(3) EYVL N:o L 83, 30.3.1973, s. 21
(4) EYVL N:o L 108, 22.4.1974, s. 7
(5) EYVL N:o L 32, 5.2.1975, s. 26
(6) EYVL N:o L 102, 15.4.1976, s. 8
(7) EYVL N:o L 246, 29.8.1981, s. 32
(8) EYVL N:o L 279, 20.12.1971, s. 7
(9) EYVL N:o L 123, 29.5.1972, s. 6
(10) EYVL N:o L 206, 29.7.1978, s. 43
(11) EYVL N:o L 15, 18.1.1984, s. 28
(12) EYVL N:o L 257, 10.9.1981, s. 38

LIITE

SPIRAMYSIININ MÄÄRITYS DIFFUUSIOLLA AGARALUSTASSA

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää rehujen ja esiseosten spiramysiinipitoisuus. Määrityksen alaraja on 1 mg/kg (1 miljoonasosaa) (1).

2 Periaate

Näyte uutetaan metanoli/fosfaatti-vetykarbonaattipuskuri-seoksella pH-arvossa 8. Uute dekantoidaan tai sentrifugoidaan ja laimennetaan. Antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla spiramysiinin diffuusio agaralustalla, johon on ympätty *Micrococcus luteusta*. Diffuusio mitataan inhibitiovyöhykkeinä, jotka mikro-organismi muodostaa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on käytetyissä antibioottikonsentraatioissa suoraan verrannollinen antibioottikonsentraation logaritmiin.

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

3.1 *Kantaviljelmän kasvatus*

Kasvatusalustasta (4.1) valmistettuja vinopintoja sisältäviin putkiin siirrostetaan *Micrococcus luteusta* ja inkuboidaan 24 tuntia 30 °C:ssa. Viljelmä säilytetään jääkaapissa noin 4 °C:ssa. Siirrostus suoritetaan uudelleen joka toinen viikko.

3.2 *Bakteerisuspension valmistus* (a)

Äskettäin valmistetusta agarvinopinnasta (3.1) kasvusto huuhdellaan 2–3 ml:lla natriumkloridiliuosta (4.3). Suspensio siirrostetaan 250 ml:aan kasvatusliuosta (4.1), joka on steriilissä Roux-pullossa ja inkuboidaan 18–20 tuntia 30 °C:ssa. Kasvusto huuhdotaan 25 ml:aan natriumkloridiliuosta (4.3) ja homogenoidaan. Suspensio laimennetaan suhteessa 1/10 natriumkloridiliuoksella (4.3). Suspension valon transmission on oltava noin 75 % mitattuna 650 nm:ssa 1 cm:n kyvetissä natriumkloridiliuosta (4.3) vastaan. Suspensiota voidaan säilyttää yhden viikon ajan noin 4 °C:ssa.

4 Kasvatusalustat ja reagenssit

4.1 *Kasvatusalusta* (b)

Lihapeptoni	6,0 g
Tryptoni	4,0 g
Hiivauute	3,0 g
Lihauute	1,5 g
Glukoosi	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vesi	1 000 ml

pH 6,5–6,6 (steriloinnin jälkeen).

4.2 *Määritysalusta (b)*

Tryptoni	5,0 g
Hiivauute	4,0 g
Lihauute	3,0 g
Agar	10,0 g–20,0 g
Vesi	1 000 ml

pH 8,0 (steriloinnin jälkeen).

---

(1) 1 mg spiramysiiniperusvalmistetta vastaa 3 200 kansainvälistä yksikköä (ky).

(a) Voidaan käyttää muita menetelmiä edellyttäen, että niiden käytöstä on osoitettu saatavan samanlaisia bakteerisuspensioita.

(b) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

4.3 *0,8 % (w/v) natriumkloridiliuos*

Liuotetaan 8 g natriumkloridia veteen ja laimennetaan 1 000 ml:ksi; steriloidaan.

4.4 *Fosfaattivetykarbonaattipuskuriliuos, pH 8,0*

Dikaliumvetyfosfaatti, K_2HPO_4	16,7 g
Kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4	0,5 g
Natriumvetykarbonaatti	20,0 g
Vesi, lisätään	1 000 ml:ksi

4.5 *Metanoli-fosfaattivetykarbonaattipuskuri (4.4) -seos*

50/50 (v/v)

4.6 *Standardiyhdiste*

Tunnetun aktiivisuuden (kansainvälisenä yksikkönä ky) omaava spiramysiini.

5 Standardiliuokset

Seokseen (4.5) liuotetaan tarkasti punnittu määrä standardiyhdistettä (4.6) ja samaa seosta käyttäen tehdään laimennus, josta saadaan 1 000 ky:ta spiramysiiniä/millilitra sisältävä kantaliuos. Tämä liuos säilyy 4 °C:ssa tulpalla suljetussa pullossa viisi päivää.

Tästä kantaliuoksesta valmistetaan peräkkäin laimentaen seosta (4.5) käyttäen seuraavat liuokset:

S_8	1	ky/ml
S_4	0,5	ky/ml
S_2	0,25	ky/ml
S_1	0,125	ky/ml

6 Uutteen ja määritysliuosten valmistus

6.1 *Uutto*

Rehuja punnitaan 20,0 g:n ja rehuseoksia 1,0–20,0 g:n suuruinen näyte. Lisätään 100 ml seosta (4.5) ja ravistellaan 30 minuuttia. Sentrifugoidaan tai dekantoidaan ja supernatantti laimennetaan seoksella (4.5) siten, että odotetuksi spiramysiinipitoisuudeksi saadaan 1 ky/ml (= U_8).

Kun rehun spiramysiinimäärät ovat alle 2,5 mg/kg, uutto suoritetaan seuraavasti. Näytettä punnitaan 20,0 g:aa. Lisätään 100 ml seosta (4.5) ja ravistellaan 30 minuuttia. Sentrifugoidaan muutaman minuutin ajan, otetaan 50 ml supernatanttia ja haihdutetaan se noin 4 ml:ksi alipaineessa pyöröhaihduttajassa alle 40 °C:n lämpötilassa. Jäännös laimennetaan seoksella (4.5) siten, että odotetuksi spiramysiinipitoisuudeksi saadaan 1 ky/ml (= U_8).

6.2 *Määritysliuokset*

Valmistetaan U_8-liuoksesta liuokset U_4 (odotettu pitoisuus: 0,5 ky/ml), U_2 (odotettu pitoisuus: 0,25 ky/ml) ja U_1 (odotettu pitoisuus: 0,125 ky/ml) peräkkäin laimentaen (1 + 1) seoksella (4.5).

7 Menettely

7.1 *Siirrostus määritysalustaan*

Bakteerisuspensiota (3.2) siirrostetaan noin 50 °C:ssa määritysalustaan (4.2). Alustasta (4.2) valmistetuilla maljoilla tehdyillä esikokeilla määritetään se bakteerisuspensiomäärä, jolla eri spiramysiinikonsentraatioilla saadaan suurimmat ja kirkkaimmat inhibitiovyöhykkeet.

7.2 *Maljojen valmistus*

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen neljää standardiliuoskonsentraatiota (S_8, S_4, S_2, S_1) ja neljää määritysliuoskonsentraatiota (U_8, U_4, U_2, U_1). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä neljä uute- ja standardikonsentraatiota. Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agaralustaan voidaan tehdä ainakin kahdeksan reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm ja joiden keskustat ovat vähintään 30 mm:n päässä toisistaan. Voidaan käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Maljoille kaadetaan sellainen määrä 7.1 kohdan mukaisesti siirrostettua alustaa (4.2), joka muodostaa noin 2 mm paksun kerroksen (kun malja on vetoisuudeltaan 60 ml ja läpimitaltaan 200 mm). Jäähdytetään vaakasuoralla alustalla, tehdään reiät ja niihin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet määritys- ja standardiliuoksia (läpimitasta riippuen välillä 0,10–0,15 ml/reikä). Kutakin pitoisuutta käytetään ainakin neljä kertaa siten, että kussakin määrityksessä suoritetaan arviointi 32 inhibitiovyöhykkeestä.

7.3 *Inkubointi*

Maljoja inkuboidaan 16–18 tuntia 30 ± 2 °C:ssa.

8 **Laskeminen**

Inhibitiovyöhykkeiden läpimitta mitataan 0,1 mm:n tarkkuudella. Kutakin pitoisuutta vastaavista mittausten keskiarvoista piirretään puolilogaritmipaperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritmia inhibitiovyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Piirretään sekä standardiliuoksen että uutteen osalta parhainta sovitusta edustavat suorat esimerkiksi seuraavasti.

Parhainta sovitusta edustava piste matalimman standardipitoisuuden (SL) osalta määritetään käyttäen kaavaa:

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

Parhainta sovitusta edustava piste korkeimman standardipitoisuuden (SH) osalta määritetään käyttäen kaavaa:

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

Parhaan sovituksen omaavat pisteet lasketaan samoin uutteen matalimman pitoisuuden (UL) ja uutteen korkeimman pitoisuuden (UH) osalta korvaamalla yllä olevissa kaavoissa s_1, s_2, s_4 ja s_8 u_1:lla, u_2:lla, u_4:lla ja u_8:lla [1].

Lasketut SL- ja SH-arvot merkitään samalle kuvaajapaperille ja ne yhdistetään parhaimman sovituksen omaavan suoran muodostamiseksi standardiliuoksen osalta. Samoin merkitään UL- ja UH-arvot ja ne yhdistetään parhaimman sovituksen omaavan suoran muodostamiseksi uutteen osalta.

Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, pitäisi suorien olla yhdensuuntaiset. Käytännössä suorien voidaan katsoa olevan yhdensuuntaiset, jos arvot (SH–SL) ja (UH–UL) eivät eroa niiden keskiarvosta yli 10 %.

Jos suorat eivät ole yhdensuuntaiset, joko u_1 ja s_1 tai u_8 ja s_8 voidaan hylätä ja SL, SH, UL ja UH laskea käyttäen vaihtoehtoisia kaavoja vaihtoehtoisten parhaimman sovituksen omaavien suorien muodostamiseksi:

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

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

ja käyttäen samoja kaavoja UL:n ja UH:n tapauksissa. Yhdensuuntaisuuden on oltava samojen periaatteiden mukainen. Tulosten laskeminen kolmea pitoisuutta käyttäen on merkittävä määritysselosteeseen.

[1] Pienet kirjaimet "s" ja "u" tarkoittavat inhibitiovyöhykkeiden läpimittoja.

Kun suoria pidetään yhdensuuntaisina, suhteellisen aktiivisuuden logaritmi (log A) lasketaan jollain seuraavista kaavoista:

Neljän pitoisuuden osaltas

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

Kolmen pitoisuuden osalta

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

tai

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

Näytteestä saadun uutteen aktiivisuus = asiaankuuluvan standardin aktiivisuus × A

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

Jos suhteellisen aktiivisuuden havaitaan olevan alueen 0,5–2,0 ulkopuolella, määritys suoritetaan uudelleen siten, että uutteen konsentraatiot säädetään sopiviksi tai, jos tämä ei ole mahdollista, standardiliuosten konsentraatiot säädetään sopiviksi. Kun suhteellista aktiivisuutta ei saada tuotua vaaditulle alueelle, on mikä tahansa saatu tulos katsottava likimääräiseksi ja tämä on mainittava määritysselosteessa.

Kun suoria ei pidetä yhdensuuntaisina, määritys toistetaan. Jos yhdensuuntaisuutta ei vieläkään saada aikaan, määritystä ei voida pitää hyväksyttävänä.

Tulokset ilmoitetaan milligrammoina spiramysiiniperusvalmistetta rehukiloa kohti.

9 **Toistettavuus**

Samasta näytteestä suoritettujen kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

- 2 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, korkeintaan 10 mg/kg olevien spiramysiinipitoisuuksien osalta;
- 20 %, suurimpaan arvoon verrattuna, välillä 10–25 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta;
- 5 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, yli 25 ja korkeintaan 50 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta;
- 10 %, suurimpaan arvoon verrattuna, yli 50 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta.