384L0425

Nr L 238/34 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* 6.9.84

KOMMISSIONENS TIONDE DIREKTIV

av den 25 juli 1984

om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(84/425/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen[1], senast ändrat genom Anslutningsakten för Grekland, särskilt artikel 2 i denna, och

med beaktande av följande:

I det ovan nämnda direktivet krävs att den officiella foderkontrollen skall utföras med användning av gemenskapsmetoder för provtagning och analys i syfte att kontrollera att fodret motsvarar de krav som framgår av bestämmelser i lagar och andra författningar beträffande foders kvalitet och sammansättning.

I kommissionens direktiv 71/250/EEG[2], 73/46/EEG[3], 74/203/EEG[4], 75/84/EEG[5], 76/372/EEG[6], senast ändrade genom direktiv 81/680/EEG[7], direktiv 71/393/EEG[8], 72/199/EEG[9], 78/633/EEG[10], senast ändrade genom direktiv 84/4/EEG[11] och direktiv 81/715/EEG[12] har redan ett antal gemenskapsmetoder för analys fastställts. Mot bakgrund av den utveckling som därefter skett på området är det lämpligt att nu anta en ny metod.

De åtgärder som beslutas i detta direktiv är förenliga med Ständiga foderkommitténs yttrande.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med den metod som beskrivs i bilagan då det gäller halter av spiramycin.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv senast den 30 juni 1985 och skall genast underrätta kommissionen om detta.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 25 juli 1984.

På kommissionens vägnar

Poul DALSAGER

Ledamot av kommissionen

---

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

BILAGA

BESTÄMNING AV SPIRAMYCIN GENOM DIFFUSION I AGARSUBSTRAT

1. Syfte och räckvidd

Denna metod är avsedd för bestämning av spiramycin i foder och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 1 mg/kg (1 ppm) (1).

2. Princip

Provet extraheras med en blandning av metanol/fosfat-bikarbonatbuffert vid pH 8. Extraktet dekanteras eller centrifugeras och späds. Dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av spiramycinets diffusion i ett agarsubstrat som inokulerats med *Micrococcus luteus*. Diffusion kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen på den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

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

3.1 *Skötsel av den lagerhållna odlingen*

Inokulera provrör som innehåller skikt av odlingssubstrat (4.1) med *Micrococcus luteus* och inkubera under 24 timmar vid 30 °C. Förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C. Upprepa inokuleringen varannan vecka.

3.2 *Beredning av bakteriesuspensionen* (a)

Samla in tillväxten från nyprepararad snedagar (3.1) med 2–3 ml koksaltlösning (4.3). Använd denna suspension till att inokulera 250 ml odlingssubstrat (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera under 18–20 timmar vid 30 °C. Samla in tillväxten i 25 ml koksaltlösning (4.3) och blanda. Späd suspensionen 1:10 med koksaltlösning (4.3). Suspensionens ljustransmission måste vara cirka 75 %, mätt vid 650 nm i en 1 cm-cell mot koksaltlösning (4.3). Denna suspension kan förvaras i en vecka vid cirka 4 °C.

4. Odlingssubstrat och reagens

4.1 *Odlingssubstrat* (b)

Köttpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 6,5–6,6 (efter sterilisering)	

4.2 *Analysssubstrat* (b)

Trypton	5,0 g
Jästextrakt	4,0 g
Köttextrakt	3,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 8,0 (efter sterilisering)	

(1) 1 mg spiramycinbas motsvarar 3 200 internationella enheter (IE).
(a) Andra metoder kan användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande bakteriesuspensioner.
(b) Varje kommersiellt odlingssubstrat med liknande sammansättning som ger samma resultat kan användas.

4.3 *Koksaltlösning 0,8 % (vikt/volym)*

Lös upp 8 g natriumklorid i vatten och späd till 1 000 ml. Sterilisera.

4.4 *Fosfat-bikarbonatbuffert, pH 8,0*

Dikaliumvätefosfat, K_2HPO_4	16,7 g
Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4	0,5 g
Natriumvätekarbonat, $NaHCO_3$	20,0 g
Vatten till	1 000 ml

4.5 *Blandning metanol/fosfat-bikarbonatbuffert* (4.4)

50/50 (volym/volym).

4.6 *Standardsubstans*

Spiramycin med känd aktivitet (i IE).

5. Standardlösningar

Lös upp en noggrant uppvägd mängd standardsubstans (4.6) i blandningen (4.5) och späd med samma blandning så att en utgångslösning erhålls som innehåller 1 000 IE spiramycin per milliliter. Om denna lösning förvaras i en tillsluten kolv vid 4 °C är den stabil i upp till fem dagar.

Av denna utgångslösning bereds genom successiv utspädning med blandningen (4.5) följande lösningar:

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

6. Beredning av extraktet och analyslösningar

6.1 *Extraktion*

Väg upp 20,0 g foderprov resp. 1,0–20,0 g premixprov. Tillsätt 100 ml av blandningen (4.5) och skaka om under 30 minuter. Centrifugera eller dekantera och späd supernatantlösningen med blandningen (4.5) så att en förväntad spiramycinhalt av 1 IE/ml (= U_8) erhålls.

Om de förväntade spiramycinhalterna är lägre än 2,5 mg/kg foder måste extraktionen utföras på följande sätt: Väg upp 20,0 g av provet. Tillsätt 100 ml av blandningen (4.5) och skaka om under 30 minuter. Centrifugera under några minuter, ta 50 ml av supernatantlösningen och indunsta till cirka 4 ml med reducerat tryck i rotationsindunstare vid högst 40 °C. Späd återstoden med blandningen (4.5) så att en förväntad spiramycinhalt av 1 IE/ml (= U_8) erhålls.

6.2 *Analyslösningar*

Av lösning U_8 bereds lösningarna U_4 (förväntad halt: 0,5 IE/ml), U_2 (förväntad halt: 0,25 IE/ml) och U_1 (förväntad halt: 0,125 IE/ml) genom successiv utspädning (1+1) med blandningen (4.5).

7. Analysmetod

7.1 *Inokulering av analyssubstratet*

Inokulera analyssubstratet (4.2) med bakteriesuspensionen (3.2) vid cirka 50 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med analyssubstratet (4.2) vilken mängd av bakteriesuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av spiramycin.

7.2 *Preparering av plattorna*

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (S_8, S_4, S_2 och S_1) och av analyslösningen (U_8, U_4, U_2 och U_1). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och med minst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarsubstratet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av substratet (4.2), som inokulerats enligt 7.1, att ett cirka 2 mm tjockt lager bildas (60 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stabiliseras, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning i hålen (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter). Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

7.3 *Inkubation*

Inkubera plattorna under 16–18 timmar vid 30 ± 2 °C.

8. **Utvärdering**

Mät hämningszonernas diameter med 0,1 mm noggrannhet. För in genomsnittsvärdena för varje koncentration på semilogaritmiskt rutat papper så att logaritmen på koncentrationerna i förhållande till hämningszonernas diameter visas. Fastställ optimumlinjerna för såväl standardlösningen som extraktet, t.ex. enligt följande:

Bestäm optimumpunkten för lägsta nivå standardlösning (SL) med formeln:

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

Bestäm optimumpunkten för högsta nivå standardlösning (SH) med formeln:

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut s_1, s_2, s_4 och s_8 mot u_1, u_2, u_4 och u_8 i ovanstående formler [1].

För in de beräknade värdena för SL och SH på samma papper och förbind dem så att optimumlinjen för standardlösningen erhålls. För på motsvarande sätt in UL och UH och förbind dem så att optimumlinjen för extraktet erhålls.

Om ingen interferens förekommer skall linjerna vara parallella. För praktiska ändamål kan linjerna anses vara parallella om värdena (SH-SL) och (UH-UL) inte avviker med mer än 10 % från sina medelvärden.

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen u_1 och s_1 eller u_8 och s_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med följande alternativformler så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma kontroll som tidigare måste göras av parallelliteten. Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

[1] De små bokstäverna "s" och "u" avser hämningszonernas diametrar.

När linjerna kan anses parallella, beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten (log A) med någon av följande formler, beroende på om tre eller fyra nivåer har använts för att fastställa parallelliteten:

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Provextraktets aktivitet = motsvarande standardlösnings aktivitet × A

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

Om den relativa aktiviteten befinns ligga utanför intervallet 0,5–2,0 skall analysen upprepas med lämpliga justeringar av koncentrationerna av extraktet eller, om detta inte är möjligt, av standardlösningarna. Om den relativa aktiviteten inte kan bringas inom det intervall som krävs måste varje resultat betraktas som approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår måste bestämningen anses vara otillfredsställande.

Uttryck resultatet i mg spiramycinbas per kg foder.

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov av samma analytiker får inte överstiga

- 2 mg/kg, absolutvärde, för halter av spiramycinbas upp till och med 10 mg/kg,
- 20 % i förhållande till det högsta värdet för halter över 10 och till och med 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, absolutvärde, för halter över 25 och till och med 50 mg/kg,
- 10 % i förhållande till det högsta värdet för halter över 50 mg/kg.