KOMMISSION

ZEHNTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 25. Juli 1984

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(84/425/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN --

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln (1), zuletzt geändert durch die Beitrittsakte, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe :

Die obengenannte Richtlinie bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen hinsichtlich der Beschaffenheit und der Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

In den Richtlinien der Kommission 71/250/EWG (2), 73/46/EWG (3), 74/203/EWG (4), 75/84/EWG (5), 76/372/EWG (6), zuletzt geändert durch die Richtlinie 81/680/EWG (7), die Richtlinien 71/393/EWG (8), 72/199/EWG (9), 78/633/EWG (10), zuletzt geändert durch die Richtlinie 84/4/EWG (11), sowie die Richtlinie 81/715/EWG (12) wurden bereits eine Reihe von gemeinschaftlichen Analysemethoden festgelegt.

Der Stand der seitdem durchgeführten Arbeiten ermöglicht es nunmehr, eine neue Methode festzulegen.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN :

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Spiramycin nach im Anhang zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten setzen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie spätestens am 30. Juni 1985 nachzukommen und setzen die Kommission hiervon in Kenntnis.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 25. Juli 1984

Für die Kommission

Poul DALSAGER

Mitglied der Kommission

(1) ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.
(2) ABl. Nr. L 155 vom 12. 7. 1971, S. 13.
(3) ABl. Nr. L 83 vom 30. 3. 1973, S. 21.
(4) ABl. Nr. L 108 vom 22. 4. 1974, S. 7.
(5) ABl. Nr. L 32 vom 5. 2. 1975, S. 26.
(6) ABl. Nr. L 102 vom 15. 4. 1976, S. 8.
(7) ABl. Nr. L 246 vom 29. 8. 1981, S. 32.
(8) ABl. Nr. L 279 vom 20. 12. 1971, S. 7.
(9) ABl. Nr. L 123 vom 29. 5. 1972, S. 6.
(10) ABl. Nr. L 206 vom 29. 7. 1978, S. 43.
(11) ABl. Nr. L 15 vom 18. 1. 1984, S. 28.
(12) ABl. Nr. L 257 vom 10. 9. 1981, S. 38.

ANHANG

BESTIMMUNG VON SPIRAMYCIN DURCH DIFFUSION IN AGARNÄHRBODEN

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient zur Bestimmung von Spiramycin in Futtermitteln und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 1 mg/kg (1 ppm) (1).

2. Prinzip

Die Probe wird bei pH 8 mit einer Mischung aus Methanol und Phosphat — Bicarbonatpuffer extrahiert. Der Extrakt wird dekantiert oder zentrifugiert und verdünnt. Seine antibiotische Aktivität wird durch Messung der Diffusion des Spiramycins in einem mit Micrococcus luteus beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen des Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen wird für den Bereich der angewandten Konzentration als dem Logarithmus der Konzentration an Antibiotikum direkt proportional angesehen.

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

3.1. *Haltung der Stammkultur*

Agarschrägröhrchen mit Kulturnährboden (4.1) werden mit Micrococcus luteus beimpft und 24 Stunden lang bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird im Kühlschrank bei etwa 4 °C aufbewahrt und alle zwei Wochen neu überimpft.

3.2. *Herstellung der Bakteriensuspension* (a)

Eine junge Kultur auf Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2 bis 3 ml Natriumchloridlösung (4.3) abgewaschen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 250 ml des Nährbodens (4.1) enthält, beimpft und 18 bis 20 Stunden bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird in 25 ml Natriumchloridlösung (4.3) aufgenommen und gemischt. Die Suspension wird im Verhältnis 1/10 mit Natriumchloridlösung (4.3) verdünnt. Die Lichtdurchlässigkeit der Suspension soll bei 650 nm und 1 cm Schichtdichte gegen Natriumchloridlösung (4.3) bei 75 v. H. liegen. Diese Suspension kann mindestens eine Woche lang bei 4 °C aufbewahrt werden.

4. Nährböden und Reagenzien

4.1. *Kulturnährböden* (b)

Fleischpepton	6,0 g
Caseinpepton	4,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Fleischextrakt	1,5 g
Glukose	1,0 g
Agar	10,0 bis 20,0 g
Wasser	1 000 ml
pH 6,5 — 6,6 (nach Sterilisation)	

4.2. *Testnährböden* (b)

Caseinpepton	5,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
Agar	10,0 bis 20,0 g
Wasser	1 000 ml
pH 8,0 (nach Sterilisation)	

(1) 1 mg Spiramycinbase entspricht 3 200 internationalen (IE). E).
(a) Andere Methoden, die entsprechende Bakteriensuspensionen ergeben, können verwendet werden.
(b) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

4.3. *Natriumchloridlösung 0,8 v. H. (G/V)*

8 g Natriumchlorid werden in Wasser aufgelöst, auf 1 000 ml verdünnt und sterilisiert.

4.4. *Phosphat — Bicarbonatpuffer, pH 8,0*

Di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	16,7 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	0,5 g
Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$	20,0 g
Wasser	1 000 ml

4.5. *Mischung aus Methanol und Phosphat-Bicarbonatpuffer* (4.4)

50/50 (V/V).

4.6. *Standardsubstanz*

Spiramycin mit bekannter Aktivität (in IE).

5. Standardlösungen

Eine genau abgewogene Menge der Standardsubstanz (4.6) wird in der Mischung (4.5) aufgelöst und verdünnt, um eine Stammlösung, die 1 000 IE Spiramycin je ml enthält, zu erhalten. In verschlossener Flasche und bei 4 °C aufbewahrt bleibt diese Lösung 5 Tage lang haltbar.

Aus dieser Stammlösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit der Mischung (4.5) folgende Lösungen hergestellt:

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

6. Herstellung des Extrakts und der Testlösungen

6.1. *Extraktion*

Für Futtermittel wird eine Menge von 20,0 g der Probe, für Vormischungen eine Menge von 1,0 — 20,0 g abgewogen, mit 100 ml der Mischung (4.5) versetzt und 30 Minuten lang geschüttelt. Der Extrakt wird dekantiert oder zentrifugiert und der Überstand mit der Mischung (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Spiramycingehalt von 1 IE/ml ($=U_8$) zu erhalten.

Für erwartete Spiramycingehalte, die geringer als 2,5 mg/kg Futtermittel liegen, muß die Extraktion wie folgt durchgeführt werden. Eine Menge von 20,0 g der Probe wird abgewogen, 100 ml der Mischung (4.5) hinzugefügt und 30 Minuten lang geschüttelt. Der Extrakt wird wenige Minuten lang zentrifugiert, 50 ml des Überstands entnommen und auf ungefähr 4 ml in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von höchstens 40 °C eingedampft. Der Rückstand wird mit der Mischung (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Spiramycingehalt von 1 IE/ml ($= U_8$) zu erhalten.

6.2. *Testlösungen*

Aus der Lösung U_8 werden aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) mit der Mischung (4.5) die Lösungen U_4 (erwarteter Gehalt: 0,5 IE/ml), U_2 (erwarteter Gehalt: 0,25 IE/ml) und U_1 (erwarteter Gehalt: 0,125 IE/ml) hergestellt.

7. Testverfahren

7.1. *Beimpfung des Nährbodens*

Der Testnährboden (4.2) wird mit der Bakteriensuspension (3.2) bei ungefähr 50 °C beimpft. In Vorversuchen auf Platten mit dem Testnährboden (4.2) wird die Menge des Inokulums ermittelt, die möglichst große aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen verwendeten Konzentrationen an Spiramycin ergibt.

7.2. *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je vier Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und der Testlösung (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle vier Konzentrationen des Standards und des Extrakts. Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens acht Löcher mit einem Durchmesser von 10 bis 13 mm und mindestens 30 mm zwischen den Lochzentren in die Nährbodenschicht gestanzt werden können. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem daraufgelegten plangedrehten Aluminium oder Kunststoffring mit 200 mm Durchmesser und 20 mm Höhe hergestellt werden.

Auf die Platten wird eine Menge des nach 7.1 beimpften Testnährbodens (4.1) gegossen, daß sich eine ca. 2 mm dicke Schicht ergibt (60 ml für eine Platte von 200 mm Durchmesser). Nachdem die Schicht fest geworden ist, werden die Löcher gestanzt und genau abgemessene Mengen der Standard- und Testlösungen einpipettiert (zwischen 0,10 und 0,15 ml pro Loch, je nach Lochdurchmesser). Jede Konzentration muß mindestens in vierfacher Wiederholung angewendet werden, so daß für jeden Test 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3. *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt während 16 bis 18 Stunden bei 30 °C (± 2 °C).

8. Auswertung

Der Durchmesser der Hemmzonen wird auf 0,1 mm genau gemessen. Für jede Konzentration werden die Mittelwerte auf Semi-Logarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentration gegen den Durchmesser der Hemmzonen eingetragen wird. Für die Standardlösung sowie für den Extrakt werden die geeignetsten Geraden — wie beispielsweise nachstehend berechnet — gezogen.

Der geeignetste Punkt für das niedrigste Niveau der Standardlösung (SL) wird nach folgender Formel ermittelt:

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

Der geeignetste Punkt für das höchste Niveau der Standardlösung (SH) wird nach folgender Formel ermittelt:

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

Genauso werden auf die geeignetsten Punkte für das niedrigste (UL) und höchste Niveau (UH) des Extrakts ermittelt, indem in der obigen Formel — anstelle von s_1, s_2, s_4 und s_8 — u_1, u_2, u_4 und u_8 eingesetzt werden (1).

Die ermittelten SL- und SH-Werte werden auf dasselbe Diagramm aufgetragen. Indem man die beiden Punkte miteinander verbindet, erhält man die geeignetste Gerade für die Standardlösung. Ebenso wird mit den UL- und UH-Werten verfahren, um die geeignetste Gerade für den Extrakt zu erhalten.

In Abwesenheit von Störfaktoren sollten die Geraden parallel sein. Für die Praxis können die Geraden als parallel angesehen werden, wenn die Werte (SH-SL) und (UH-UL) nicht mehr als 10 v. H. vom Mittelwert abweichen.

Falls die Geraden nicht parallel sind, kann man entweder u_1 und s_1 oder u_8 und s_8 ausschalten. Dann sind die Werte SL, SH, UL und UH mit folgenden Formeln zu ermitteln, um die geeignetste Gerade zu erhalten:

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

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

Ebenso wird für UL und UH verfahren. Die Ergebnisse sollten denselben Parallelitätsanforderungen entsprechen. Falls die Ergebnisse aus drei Niveaus ermittelt wurden, sollte dies im Analyseprotokoll vermerkt werden.

(1) Die Kleinbuchstaben s und u beziehen sich auf den Durchmesser der Inhibitionszonen.

Wenn die Geraden als parallel anzusehen sind, wird der Logarithmus der relativen Aktivität (log. A) durch eine der folgenden Formeln ermittelt, je nachdem, ob drei oder vier Niveaus für die Beurteilung der Parallelität verwendet wurden.

Für 4 Niveaus

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

Für 3 Niveaus

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

oder

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

Aktivität des Probenextrakts = Aktivität des jeweiligen Standards × A

$$U_8 = S_8 \times A$$

Wenn die relative Aktivität außerhalb des Bereichs der Werte 0,5 bis 2,0 liegt, wird die Bestimmung bei entsprechender Anpassung der Extraktkonzentrationen oder, falls dies nicht möglich ist, der Standardlösungen wiederholt. Falls die relative Aktivität nicht in den Bereich der erforderlichen Werte gebracht werden kann, sind alle Ergebnisse als annähernd anzusehen und dies sollte im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden nicht als parallel anzusehen sind, wird die Bestimmung wiederholt. Wenn noch keine Parallelität erreicht wurde, ist die Bestimmung als unbefriedigend anzusehen.

Das Ergebnis wird in Milligramm Spiramycinbase je kg Futtermittel ausgedrückt.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Parallel-Bestimmungen eines Analytikers sollte bei ein und derselben Probe bei Gehalten von

— bis zu 10 mg Spiramycinbase/kg — 2 mg/kg absolut,
— 10—25 mg/kg — 20 v. H. des höheren Resultats,
— 25—50 mg/kg — 5 mg/kg absolut,
— über 50 mg/kg — 10 v. H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.