COMMISSIONE

DECIMA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 25 luglio, 1984

che fissa i metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali

(84/425/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali (1), modificata da ultimo dall'atto di adesione della Grecia, in particolare l'articolo 2,

considerando che la suddetta direttiva prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per animali destinati a constatare l'osservanza delle condizioni prescritte in virtù delle disposizioni legislative, regolamentari o amministrative, concernenti le qualità e la composizione degli alimenti per animali, siano effettuati secondo i modi di prelievo di campioni ed i metodi di analisi comunitari;

considerando che le direttive della Commissione 71/250/CEE (2), 73/46/CEE (3), 74/203/CEE (4), 75/84/CEE (5) e 76/372/CEE (6), modificate da ultimo dalla direttiva 81/680/CEE (7), le direttive 71/393/CEE (8), 72/199/CEE (9) e 78/633/CEE (10), modificate da ultimo dalla direttiva 84/4/CEE (11), come pure la direttiva 81/715/CEE (12), hanno già fissato un certo numero di metodi di analisi comunitari; che, tenuto conto dello stato di avanzamento dei lavori sin qui effettuati, è necessario adottare un nuovo metodo;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente per gli alimenti per gli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali, per quanto riguarda il loro contenuto in spiramicina, siano effettuate secondo il metodo descritto nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Gli Stati membri curano l'entrata in vigore, entro e non oltre il 30 giugno 1985, delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva e ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 25 luglio 1984.

Per la Commissione

Poul DALSAGER

Membro della Commissione

---

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

ALLEGATO

DOSAGGIO DELLA SPIRAMICINA PER DIFFUSIONE IN AGAR

1. Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo permette di dosare la spiramicina nei mangimi e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di 1 mg/kg (1 ppm) (1).

2. Principio

Il campione viene estratto con una miscela di metanolo e di tampone fosfato-bicarbonato a pH 8. L'estratto viene decantato o centrifugato e poi diluito. La sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione della spiramicina su terreno agarizzato, insemenzato con *Micrococcus luteus*. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microrganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico nel campo delle concentrazioni utilizzate.

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

3.1. *Conservazione del ceppo*

Insemenzare con *Micrococcus luteus* il terreno colturale (4.1) distribuito in provette a becco di clarino. Incubare per 24 ore a 30 °C, conservare in frigorifero a 4 °C circa e trapiantare ogni 15 giorni.

3.2. *Preparazione della sospensione batterica* (a)

Mediante 2-3 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3), raccogliere la patina di una agarcoltura (3.1) preparata di recente. Con tale sospensione, insemenzare una bottiglia di Roux contenente 250 ml del terreno di coltura (4.1); incubare per 18-20 ore a 30 °C. Raccogliere i germi con 25 ml di soluzione di cloruro di sodio (4.3) e omogeneizzare. Diluire a 1/10 la sospensione mediante la soluzione di cloruro di sodio (4.3). La trasmittanza della sospensione, misurata a 650 mm sotto lo spessore di 1 cm in confronto con la soluzione di cloruro di sodio (4.3), deve essere del 75 % circa. Questa sospensione può essere conservata per una settimana alla temperatura di 4 °C circa.

4. Terreni colturali e reattivi

4.1. *Terreno di mantenimento del ceppo* (b)

Peptone di carne	6,0 g
Triptone	4,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Acqua	1 000 ml

pH 6,5-6,6 (dopo sterilizzazione)

4.2. *Terreno di base del dosaggio* (b)

Triptone	5,0 g
Estratto di lievito	4,0 g
Estratto di carne	3,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Acqua	1 000 ml

pH 8,0 (dopo sterilizzazione)

---

(1) 1 mg di spiramicina base equivale a 3 200 unità internazionali (UI).
(a) Possono essere impiegati altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano sospensioni di batteri analoghe.
(b) Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio che dia gli stessi risultati.

4.3. *Soluzione allo 0,8 % (p/v) di cloruro di sodio*

Sciogliere in acqua 8 g di cloruro di sodio, diluire a 1 000 ml e sterilizzare.

4.4. *Tampone fosfato-bicarbonato, pH 8,0*

Idrogenofosfato bipotassico, K_2HPO_4	16,7 g
Diidrogenofosfato monopotassico, KH_2PO_4	0,5 g
Carbonato acido di sodio, $NaHCO_3$	20,0 g
Acqua q.b. a	1 000 ml

4.5. *Miscela metanolo e tampone fosfato-bicarbonato* (4.4)

50/50 (v/v).

4.6. *Sostanza di riferimento*

Spiramicina di attività nota (espressa in UI).

5. Soluzioni di riferimento

Sciogliere nella miscela (4.5) una quantità esattamente pesata della sostanza di riferimento (4.6) e diluire con la stessa miscela in modo da ottenere una soluzione madre contenente 1 000 UI di spiramicina/ml. Se conservata a 4 °C in bottiglia chiusa, questa soluzione è stabile per 5 giorni.

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive (1 : 1) con la miscela (4.5) le seguenti soluzioni :

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

6. Preparazione dell'estratto e delle soluzioni

6.1. *Estrazione*

Pesare una quantità di 20,0 g di campione per gli alimenti ; da 1,0 a 20,0 g per le premiscele. Aggiungere 100 ml della miscela (4.5) ed agitare per 30 minuti. Centrifugare o decantare, poi diluire con la miscela (4.5) il surnatante, in modo da ottenere una concentrazione presunta in spiramicina pari a 1 UI/ml ($= U_8$).

Per i contenuti di spiramicina inferiori a 2,5 mg/kg di alimento, effettuare l'estrazione come segue : Pesare una quantità di 20,0 g di campione. Aggiungere 100 ml della miscela (4.5), agitare per 30 minuti, poi centrifugare per qualche minuto. Prelevare 50 ml della soluzione surnatante ed evaporare fino a 4 ml circa in evaporatore rotante sotto depressione, a temperatura non superiore a 40 °C. Diluire il residuo con la miscela (4.5) in modo da ottenere una concentrazione presunta in spiramicina pari a 1 UI/ml ($= U_8$).

6.2. *Soluzioni dell'estratto*

A partire dalla soluzione U_8, preparare per diluizioni successive (1 : 1) con la miscela (4.5) le soluzioni U_4 (concentrazione presunta : 0,5 UI/ml), U_2 (concentrazione presunta : 0,25 UI/ml) ed U_1 (concentrazione presunta : 0,125 UI/ml).

7. Modalità di dosaggio

7.1. *Inoculazione del terreno di coltura*

Con la sospensione di batteri (3.2), insemenzare il terreno base per il dosaggio (4.2) alla temperatura di 50 °C circa. Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.2), determinare la quantità di sospensione di batteri che consente di ottenere, per le diverse concentrazioni di spiramicina, aloni di inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora netti.

7.2. *Preparazione delle piastre*

La diffusione in agar si effettua su piastre con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni della sostanza di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che si possano praticare nel terreno agarizzato almeno otto pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti tra loro meno di 30 mm. Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm.

Versare nelle piastre una quantità di terreno (4.2) insemenzato come indicato al punto 7.1, che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 2 mm circa (60 ml per una piastra di 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporvi dei volumi esattamente misurati delle soluzioni della sostanza di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro). Le operazioni descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

7.3. *Incubazione*

Incubare le piastre per 16-18 ore, alla temperatura di 30 °C ± 2 °C.

8. **Valutazione**

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto, procedendo ad esempio come segue.

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula :

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

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula :

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

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori s_1, s_2, s_4 e s_8 con quelli di u_1, u_2, u_4 ed u_8 (1).

Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL ed UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze, le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché (SH — SL) ed (UH — UL) non differiscono fra loro di più del 10 % della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia u_1 e s_1, sia u_8 e s_8. In questo caso, i valori SL, SH, UL ed UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti :

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

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

e mediante formule analoghe per UL ed UH. Se si utilizza quest'alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

(1) Le lettere minuscole « s » e « u » si riferiscono ai diametri delle zone di inibizione.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log. A) con una delle formule seguenti :

Per 4 punti

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

Per 3 punti

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

o

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

Attività dell'estratto del campione = attività dello standard corrispondente × A :

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

Se l'attività relativa si trova al di fuori della gamma di valori compresi fra 0,5 e 2,0, ripetere la determinazione procedendo ad opportune regolazioni delle concentrazioni dell'estratto o, eventualmente, delle soluzioni di riferimento. Quando tale attività non può essere ricondotta nella gamma di valori richiesta, il risultato deve essere considerato approssimativo e tale indicazione deve figurare sul certificato di analisi.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione. Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, la determinazione deve essere considerata insoddisfacente.

Esprimere il risultato in mg di spiramicina base/kg di alimento.

9. **Ripetibilità**

La differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non deve eccedere :

— 2 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti in spiramicina base inferiori a 10 mg/kg ;
— il 20 % del risultato più elevato per i contenuti da 10 a 25 mg/kg ;
— 5 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti da 25 a 50 mg/kg ;
— il 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiore a 50 mg/kg.