KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS TIENDE DIREKTIV

af 25. juli 1984

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(84/425/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer (1), senest ændret ved tiltrædelsesakten, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ved nævnte direktiv er det fastsat, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning er opfyldt, foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

der er allerede ved Kommissionens direktiv 71/250/EØF (2), 73/46/EØF (3), 74/203/EØF (4), 75/84/EØF (5), 76/372/EØF (6), senest ændret ved direktiv 81/680/EØF (7), direktiv 71/393/EØF (8), 72/199/EØF (9), 78/633/EØF (10), senest ændret ved direktiv 84/4/EØF (11), og direktiv 81/715/EØF (12), fastsat en række fællesskabsanalysemetoder; i betragtning af udviklingen siden da bør der fastsættes en ny metode;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Foderstofkomité —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer, for så vidt angår deres indhold af spiramycin, skal foretages efter den metode, der er beskrevet i bilaget til dette direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter senest den 30. juni 1985 de nødvendige ved lov eller administrativt fastsatte bestemmelser i kraft for at efterkomme bestemmelserne i dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. juli 1984.

På Kommissionens vegne

Poul DALSAGER

Medlem af Kommissionen

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

BILAG

BESTEMMELSE AF SPIRAMYCIN — VED DIFFUSION PÅ AGARPLADER

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden anvendes til bestemmelse af spiramycin i foderstoffer og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelsen er 1 mg/kg (1 ppm) (1).

2. Princip

Prøven ekstraheres med en blanding af phosphat-bicarbonatbuffer med pH 8 og methanol. Ekstraktet dekanteres eller centrifugeres og fortyndes dernæst. Dets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af spiramycin i et agarsubstrat podet med Micrococcus luteus. Diffusionen viser sig ved dannelsen af zoner, hvori mikroorganismens vækst er hæmmet. Diameteren af disse zoner anses for at være direkte proportional med logaritmen til den antibiotiske styrke inden for de anvendte koncentrationer af antibiotikum.

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

3.1. *Opbevaring af stamkulturen*

M. luteus podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes i 24 timer ved 30 °C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4 °C. Den ompodes hver anden uge.

3.2. *Fremstilling af bakteriesuspension* (a)

Væksten fra et skråargarglas (3.1) opslemmes med 2-3 ml natriumchloridopløsning (4.3). Denne opslemning anvendes til podning af 250 ml næringssubstrat (4.1) i en Roux-kolbe, og der inkuberes i 18-20 timer ved 30 °C. Væksten opslemmes i 25 ml natriumchloridopløsning (4.3) og fortyndes 10 gange med samme opløsning. Opslemningens lystransmission skal være ca. 75 pct. målt ved 650 nm mod natriumchloridopløsning (4.3) i en 1 cm celle. Opslemningen kan opbevares ved ca. 4 °C i 1 uge.

4. Næringssubstrater og reagenser

4.1. *Næringssubstrat* (b)

Kødpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gærekstrakt	3,0 g
Kødekstrakt	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 — 20,0 g
Vand	1 000 ml

pH 6,5 — 6,6 (efter sterilisering).

4.2. *Testsubstrat* (b)

Trypton	5,0 g
Gærekstrakt	4,0 g
Kødekstrakt	3,0 g
Agar	10,0 — 20,0 g
Vand	1 000 ml

pH 8,0 (efrer sterilisering).

---

(1) 1 mg spiramycinbase svarer til 3200 internationale enheder (IE).

(a) Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver tilsvarende bakteriesuspensioner.

(b) Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen, og som giver de samme resultater, kan anvendes.

4.3. *Natriumchloridopløsning, 0,8 pct. (w/v):*

8 g natriumchlorid opløses i vand, fortyndes til 1 000 ml og steriliseres.

4.4. *Phosphat-bicarbonatbuffer, pH 8,0:*

Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4	16,7 g
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	0,5 g
Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$	20,0 g
Vand til	1 000 ml.

4.5. *Blanding af phosphatbicarbonat-buffer*

(4.4) og methanol : 50/50 (v/v).

4.6. *Standardpræparat:*

spiramycin af kendt styrke (i IE.).

5. Standardopløsninger

En nøjagtigt afvejet mængde standardpræparat (4.6) opløses i blandingen (4.5) og fortyndes med denne blanding, således at der fremkommer en stamopløsning indeholdende 1 000 IE. spiramycin pr. ml. Opbevaret i tilproppede flasker ved 4 °C vil denne opløsning være holdbar i indtil 5 dage.

Af denne stamopløsning fremstilles ved successiv fortynding med blandingen (4.5) følgende opløsninger:

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

6. Fremstilling af ekstrakt og testopløsninger

6.1. *Ekstraktion*

20 g af prøven afvejes for foderstoffer, 1,0 til 20,0 g for forblandinger. Der tilsættes 100 ml af blandingen (4.5) og rystes i 30 minutter. Der centrifugeres eller dekanteres, og supernatanten fortyndes med blandingen (4.5) indtil et forventet spiramycinindhold på 1 IE./ml ($\triangleq U_8$).

Hvis det forventede indhold af spiramycin er mindre end 2,5 mg pr. kg foderstof, foretages ekstraktionen således: 20,0 g af prøven afvejes. Der tilsættes 100 ml af blandingen (4.5) og rystes i 30 minuter. Der centrifugeres i nogle minutter, hvorefter der udtages 50 ml af supernatanten, som inddampes til ca. 4 ml i en rotationsfordamper under reduceret tryk og ved højst 40 °C. Remanensen fortyndes med blandingen (4.5) indtil et forventet spiramycinindhold på 1 IE./ml ($= U_8$).

6.2. *Testopløsninger*

Opløsningerne U_4 (forventet indhold: 0,5 IE./ml), U_2 (forventet indhold: 0,25 IE./ml) og U_1 (forventet indhold: 0,125 IE./ml) fremstilles af opløsning U_8 ved successiv fortynding (1 : 1) med blandingen (4.5).

7. Testmetode

7.1. *Podning af testsubstratet*

Testsubstratet (4.2) podes med bakteriesuspensionen (3.2) ved ca. 50 °C. På plader med testsubstrat (4.2) bestemmes forud den mængde bakteriesuspension, der giver de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af spiramycin.

7.2. *Forberedelse af pladerne*

Diffusionen i agar udføres på plader med de fire koncentrationer af standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og de fire koncentrationer af testopløsningen (U_8, U_4, U_2 og U_1). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst otte huller i agrarsubstratet med en diameter på 10-13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring ovenpå, 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.1), der er podet som angivet i 7.1, så der opnås et ca. 2 mm tykt lag (60 ml til en plade på 200 mm i diameter), Pladerne anbringes vandret til størkning, hullerne udstanses, og nøjagtigt afmålte mængder af test- og standardopløsning anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren). Hver koncentration skal anbringes mindst fire gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

7.3. *Inkubation*

Pladerne inkuberes i 16-18 timer ved 30 ± 2 °C.

8. **Bedømmelse**

Hæmningszonernes diameter måles med 0,1 mm nøjagtighed. Middeldiameteren for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationen i forhold til hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den »bedst tilpassede« rette linje for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet, f.eks. som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen :

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

Det »bedst tilpassede punkt« for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen :

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

På tilsvarende måde beregnes det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet (UH) ved at erstatte s_1, s_2, s_4 og s_8 med u_1, u_2, u_4 og u_8 i ovennævnte formler. (1)

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til den bedst tilpassede linje« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer til stede, som forstyrrer analysen, vil linjerne være parallele. Til praktiske formål kan linjerne betragtes som værende parallele, hvis værdiene (SH-SL) og (UH-UL) ikke afviger mere end 10 pct. fra middelværdien.

Såfremt linjerne viser sig ikke at være parallele, kan enten u_1 og s_1 eller u_8 og s_8 udelades, og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af de alternative formler, for at opnå de alternative »bedst tilpassede linjer« :

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

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

og tilsvarende for UL og UH. De samme kriterier for parallelitet skal være opfyldt. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

(1) De små bogstaver s og u henviser til hæmningszonernes diametre.

Hvis linjerne kan betragtes som værende parallelle, beregnes logaritmen til den relative styrke (log A) ved hjælp af én af følgende formler alt efter om der er anvendt tre eller fire koncentrationer til at bestemme parallelismen.

For fire koncentrationer

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

For tre koncentrationer

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

eller

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

Prøveekstraktets styrke = den pågældende standards styrke × A

f.eks. $U_8 = S_8 \times A$

Hvis den relative styrke ligger uden for området 0,5 — 2,0, gentages analysen med den fornødne tilpasning af spiramycinkoncentrationen i ekstrakterne eller, hvis dette ikke er muligt, i standardopløsningerne. Hvis den relative styrke ikke kan bringes inden for det krævede interval, må de resultater, der opnås, betragtes som tilnærmede og dette bør anføres i den endelige rapport.

Hvis linjerne ikke kan betragtes som værende parallelle, gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallelisme, må bestemmelsen betragtes som utilfredsstillende.

Resultatet udtrykkes i milligram spiramycinbase pr. kilogram foderstof.

9. **Repeterbarhed**

Forskellem mellem resultaterne af to samtidige bestemmelser, udført på samme prøve af samme person, bør ikke overstige:

— 2 mg/kg i absolut værdi for et indhold af spiramycinbase på op til 10 mg/kg;
— 20 pct. i forhold til den højeste værdi for et indhold på mellem 10 og 25 mg/kg;
— 5 mg/kg i absolut værdi for et indhold på mellem 25 og 50 mg/kg;
— 10 pct. i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 50 mg/kg.