ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΕΚΑΤΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 25ης Ιουλίου 1984

περί καθορισμού των μεθόδων κοινοτικής αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(84/425/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

την οδηγία 70/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 20ής Ιουλίου 1970 περί εισαγωγής τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων κοινοτικής ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την πράξη προσχώρησης, και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

ότι η οδηγία που αναφέρεται ανωτέρω προβλέπει ότι ο επίσημος έλεγχος των ζωοτροφών που αποβλέπει στη διαπίστωση ότι τηρούνται οι όροι που επιβάλλονται δυνάμει των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων σχετικά με την ποιότητα και τη σύνθεση των ζωοτροφών, πραγματοποιείται σύμφωνα με τους κοινοτικούς τρόπους λήψης δειγμάτων και ανάλυσης·

ότι οι οδηγίες της Επιτροπής 71/250/ΕΟΚ [2], 73/46/ΕΟΚ [3], 74/203/ΕΟΚ [4], 75/84/ΕΟΚ [5], 76/372/ΕΟΚ [6], όπως τροποποιήθηκαν τελευταία από την οδηγία 81/680/ΕΟΚ [7], οι οδηγίες 71/393/ΕΟΚ [8], 72/199/ΕΟΚ [9], 78/633/ΕΟΚ [10], όπως τροποποιήθηκαν τελευταία από την οδηγία 84/4/ΕΟΚ [11], καθώς και η οδηγία 81/715/ΕΟΚ [12], έχουν ήδη καθορίσει ένα ορισμένο αριθμό μεθόδων κοινοτικής ανάλυσης· ότι, λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση προόδου των εργασιών που πραγματοποιούνται έκτοτε, πρέπει να θεσπιστεί μια νέα μέθοδος·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Μονίμου Επιτροπής Ζωοτροφών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα κράτη μέλη επιβάλλουν οι αναλύσεις για τους επίσημους ελέγχους των ζωοτροφών, όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε spiramycine, να πραγματοποιούνται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παράρτημα.

Άρθρο 2

Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι αναγκαίες για να συμμορφωθούν προς τις διατάξεις της παρούσας οδηγίας το αργότερο στις 30 Ιουνίου 1985 και ενημερώνουν περί αυτού την Επιτροπή.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 25 Ιουλίου 1984.

Για την Επιτροπή

Poul DALSAGER

Μέλος της Επιτροπής

---

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΠΕΙΡΑΜΥΚΙΝΗΣ ΔΙΑ ΔΙΑΧΥΣΕΩΣ ΣΕ ΑΓΑΡΟΥΧΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της σπειραμυκίνης στις ζωοτροφές και τα προμίγματα. Το κατώτατο όριο προσδιορισμού είναι 1 mg/kg (1 ppm) (1).

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με μίγμα μεθανόλης και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-όξινων ανθρακικών σε pH 8. Το εκχύλισμα μεταγγίζεται ή φυγοκεντρίζεται και αραιώνεται. Η αντιβιοτική του δραστικότης προσδιορίζεται μετρώντας τη διάχυση της σπειραμυκίνης στο αγαρούχο θρεπτικό υλικό που έχει ενοφθαλμιστεί με Micrococcus luteus. Η διάχυση διαπιστώνεται από το σχηματισμό ζωνών αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης. Η διάμετρος των ζωνών αυτών θεωρείται ευθέως ανάλογη προς το λογάριθμο της συγκεντρώσεως του αντιβιοτικού για τις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

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

3.1. *Διατήρηση μητρικής καλλιέργειας*

Σωλήνες που περιέχουν κεκλιμένο θρεπτικό υλικό (4.1) ενοφθαλμίζονται με Micrococcus luteus και επωάζονται επί 24 ώρες στους 30 °C. Η καλλιέργεια διατηρείται σε ψυγείο στους 4 °C και ανανεώνεται κάθε δύο εβδομάδες.

3.2. *Προετοιμασία του μικροβιακού εναιωρήματος* (α)

Συλλέγονται τα σπόρια από ένα σωλήνα με αγαρούχο θρεπτικό υλικό (3.1) πρόσφατης παρασκευής, με τη βοήθεια 2 έως 3 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου (4.3). Το εναιώρημα αυτό χρησιμοποιείται για τον ενοφθαλμισμό 250 ml θρεπτικού υλικού (4.1) μέσα σε φιάλη Roux. Επωάζεται επί 18-20 ώρες στους 30 °C. Τα σπόρια συλλέγονται με τη βοήθεια 25 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου (4.3). Το εναιώρημα αναδεύεται και ακολούθως αραιώνεται στο 1/10 με διάλυμα χλωριούχου νατρίου (4.3). Στιβάδα του εναιωρήματος, πάχους 1 cm, εξεταζόμενη στα 650 nm ως προς διάλυμα χλωριούχου νατρίου (4.3) πρέπει να επιτρέπει τη δίοδο (light transmission) σε 75 % περίπου του προσπίπτοντος φωτός. Το εναιώρημα αυτό μπορεί να διατηρηθεί μία εβδομάδα στους 4 °C περίπου.

4. **Θρεπτικά υλικά και αντιδραστήρια**

4.1. *Θρεπτικό υλικό για τη διατήρηση του στελέχους* (β)

Πεπτόνη κρέατος	6,0 g
Τρυπτόνη	4,0 g
Εκχύλισμα μαγιάς	3,0 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Γλυκόζη	1,0 g
Άγαρ	10,0 — 20,0 g
Νερό	1 000 ml

pH 6,5 — 6,6 (μετά από αποστείρωση).

4.2 *Θρεπτικό υλικό για τον προσδιορισμό* (β)

Τρυπτόνη	5,0 g
Εκχύλισμα μαγιάς	4,0 g
Εκχύλισμα κρέατος	3,0 g
Άγαρ	10,0 — 20,0 g
Νερό	1 000 ml

pH 8,0 (μετά από αποστείρωση).

---

(1) 1 mg βάσεως σπειρομυκίνης ισοδυναμεί με 3 200 διεθνείς μονάδες (ΔΜ).

(α) Άλλες μέθοδοι μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, αν δίνουν, αποδεδειγμένα, ανάλογα μικροβιακά εναιωρήματα.

(β) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε θρεπτικό υλικό του εμπορίου το οποίο έχει ανάλογη σύσταση και δίνει τα ίδια αποτελέσματα.

4.3. *Διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,8 % (p/v)*

Διαλύονται 8 g χλωριούχου νατρίου με νερό και αραιώνονται για να ληφθεί τελικός όγκος 1 000 ml. Το διάλυμα αποστειρώνεται.

4.4. *Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-όξινων ανθρακικών, pH 8,0*

Όξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	16,7 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4	0,5 g
Όξινο ανθρακικό νάτριο, $NaHCO_3$	20,0 g
Νερό έως	1 000 ml

4.5 *Μίγμα άνυδρης μεθανόλης/ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-όξινων ανθρακικών (4.4)*

50/50 (v/v).

4.6. *Πρότυπη ουσία*

Σπειραμυκίνη γνωστής δραστικότητας (σε ΔΜ).

5. **Πρότυπα διαλύματα**

Διαλύεται μια ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα πρότυπης ουσίας (4.6) στο μίγμα (4.5) και αραιώνεται με το ίδιο μίγμα ώστε να προκύπτει μητρικό διάλυμα που περιέχει 1 000 ΔΜ σπειραμυκίνης ανά ml. Διατηρούμενο σε πωματισμένη φιάλη στους 4 °C, το διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό επί 5 ημέρες.

Από αυτό το μητρικό διάλυμα παρασκευάζονται μετά από διαδοχικές αραιώσεις με το μίγμα (4.5) τα ακόλουθα διαλύματα:

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

6. **Παρασκευή του εκχυλίσματος και των διαλυμάτων**

6.1. *Εκχύλιση*

Ζυγίζονται 20,0 g δείγματος για τις ζωοτροφές από 1,0 έως 20,0 g για τα προμίγματα. Προστίθενται 100 ml μίγματος (4.5) και αναδεύονται επί 30 λεπτά. Το μίγμα που προκύπτει φυγοκεντρείται ή τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη, και το υπερκείμενο διάλυμα αραιώνεται με το μίγμα (4.5) έτσι ώστε η αναμενόμενη περιεκτικότητα σε σπειραμυκίνη να είναι 1 ΔΜ/ml ($=U_8$).

Όταν η αναμενόμενη περιεκτικότητα της σπειραμυκίνης στη ζωοτροφή είναι μικρότερη από 2,5 mg/kg η εκχύλιση πρέπει να γίνει κατά τον ακόλουθο τρόπο: Ζυγίζονται 20,0 g δείγματος. Προστίθενται 100 ml μίγματος (4.5) και αναδεύονται επί 30 λεπτά. Φυγοκεντρείται επί λίγα λεπτά και από το υπερκείμενο διάλυμα λαμβάνονται 50 ml τα οποία εξατμίζονται υπό χαμηλή πίεση μέσα σε περιστρεφόμενη συσκευή εξατμίσεως και σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 40 °C, έως ότου απομείνουν 4 ml. Το υπόλειμμα αραιώνεται με το μίγμα (4.5), έτσι ώστε η αναμενόμενη περιεκτικότητα σε σπειραμυκίνη να είναι 1 ΔΜ/ml ($=U_8$).

6.2. *Διαλύματα του εκχυλίσματος*

Από το διάλυμα U_8 παρασκευάζονται τα διαλύματα U_4 (αναμενόμενη συγκέντρωση: 0,5 ΔΜ/ml), U_2 (αναμενόμενη συγκέντρωση: 0,25 ΔΜ/ml) και U_1 (αναμενόμενη συγκέντρωση: 0,125 ΔΜ/ml) μετά από διαδοχικές αραιώσεις (1 + 1) με το μίγμα (4.5).

7. **Τρόπος προσδιορισμού**

7.1. *Ενοφθαλμισμός του θρεπτικού υλικού*

Γίνεται ενοφθαλμισμός του θρεπτικού υλικού (4.2) με το μικροβιακό εναιώρημα (3.2) στους 50 °C περίπου. Από προκαταρκτικές δοκιμές σε τριβλία με θρεπτικό υλικό (4.2) προσδιορίζεται η ποσότητα του μικροβιακού εναιωρήματος που απαιτείται για να ληφθούν όσο το δυνατόν ευρύτερες και σαφέστερες ζώνες αναστολής με τις διάφορες συγκεντρώσεις σπειραμυκίνης.

7.2. *Προετοιμασία των τριβλίων*

Η διάχυση πάνω σε αγαρούχο θρεπτικό υλικό πραγματοποιείται μέσα σε τριβλία με τις τέσσερις συγκεντρώσεις του προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) και τις τέσσερις συγκεντρώσεις του διαλύματος του εκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Σε κάθε τριβλίο πρέπει να τοποθετηθούν απαραίτητα οι τέσσερις αυτές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος και προτύπου. Για το λόγο αυτό, το μέγεθος των τριβλίων πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να είναι δυνατόν να σχηματισθούν στο θρεπτικό υλικό τουλάχιστον οκτώ οπές διαμέτρου 10 έως 13 mm των οποίων τα κέντρα δεν απέχουν λιγότερο από 30 mm μεταξύ τους. Αντί των τριβλίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν γυάλινες πλάκες πάνω από τις οποίες τοποθετούνται δακτύλιοι από αλουμίνιο ή πλαστικό, διαμετρου 200 mm, και ύψους 20 mm.

Εισάγεται μέσα στα τριβλία ποσότητα θρεπτικού υλικού (4.2) η οποία έχει ενοφθαλμιστεί όπως περιγράφεται στο σημείο 7.1, έτσι ώστε να ληφθεί στιβάδα πάχους 2 mm περίπου (60 ml για τριβλίο διαμέτρου 200 mm). Αφήνεται να στερεοποιηθεί, ανοίγονται οι οπές και τοποθετούνται σ' αυτές επακριβώς μετρημένοι όγκοι διαλυμάτων του προτύπου και του εκχυλίσματος (0,10 έως 0,15 ml ανά οπή, ανάλογα με τη διάμετρο). Γίνονται τουλάχιστον 4 επαναλήψεις με κάθε συγκέντρωση, έτσι ώστε σε κάθε προσδιορισμό να υπολογίζονται 32 ζώνες αναστολής.

7.3. *Επώαση*

Τα τριβλία επωάζονται επί 16 έως 18 ώρες στους 30 °C ± 2 °C.

8. **Υπολογισμός**

Μετράται η διάμετρος των ζωνών αναστολής με ακρίβεια 0,1 mm. Για κάθε συγκέντρωση, οι μέσες τιμές των μετρήσεων καταγράφονται πάνω σε ημιλογαριθμικό χάρτη όπου παριστάται η σχέση του λογαρίθμου των συγκεντρώσεων ως προς τις διαμέτρους των ζωνών αναστολής. Χαράσσονται οι πιο αντιπροσωπευτικές ευθείες για το πρότυπο διάλυμα και το εκχύλισμα, ακολουθώντας τον τρόπο που περιγράφεται κατωτέρω.

Προσδιορίζεται το «πιο αντιπροσωπευτικό» σημείο για το μικρότερο διάλυμα του προτύπου (SL) βάσει του τύπου:

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

Προσδιορίζεται το «πιο αντιπροσωπευτικό» σημείο για το μεγαλύτερο διάλυμα του προτύπου (SH) βάσει του τύπου:

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

Κατά τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται τα «πιο αντιπροσωπευτικά» σημεία για το μικρότερο διάλυμα του εκχυλίσματος (UL) και το μεγαλύτερο διάλυμα του εκχυλίσματος (UH) αντικαθιστώντας τους παραπάνω τύπους τα s_1, s_2, s_4 και s_8 με u_1, u_2, u_4 και u_8 αντιστοίχως (1).

Οι τιμές SL και SH καταγράφονται στο ίδιο διάγραμμα και συνδέοντας τα δύο σημεία λαμβάνεται η «πιο αντιπροσωπευτική» ευθεία για το πρότυπο διάλυμα. Ακολουθώντας τον τρόπο για τις τιμές UL και UH λαμβάνεται η «πιο αντιπροσωπευτική» ευθεία για το εκχύλισμα.

Αν δεν υπάρχει παρεμβολή οι ευθείες πρέπει να είναι παράλληλες. Για πρακτικούς λόγους οι ευθείες μπορούν να θεωρηθούν παράλληλες αν οι τιμές (SH—SL) και (UH—UL) δεν αποκλίνουν περισσότερο από 10 % από το μέσο όρο τους.

Αν οι ευθείες δεν είναι παράλληλες μπορούν να παραλειφθούν είτε τα u_1 και s_1 είτε τα u_8 και s_8. Στην περίπτωση αυτή τα SL, SH, UL και UH υπολογίζονται από τους ακόλουθους τύπους, προκειμένου να ληφθούν «πιο αντιπροσωπευτικές» ευθείες:

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

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

Κατά τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται τα UL και UH. Τα ίδια κριτήρια παραλληλίας πρέπει να ισχύουν και στην εναλλακτική αυτή λύση. Στην τελική έκθεση πρέπει να αναφέρεται ότι για τον υπολογισμό του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκαν τρία διαλύματα.

(1) Τα μικρά στοιχεία «s» και «u» αναφέρονται στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής.

Όταν οι ευθείες θεωρούνται παράλληλες, ο λογάριθμος της σχετικής δραστικότητας (log. A) υπολογίζεται από έναν από τους ακόλουθους τύπους, ανάλογα με το αν χρησιμοποιήθηκαν 3 ή 4 διαλύματα για την εκτίμηση της παραλληλίας:

Για 4 διαλύματα

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

Για 3 διαλύματα

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

ή

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

Δραστικότητα του εκχυλίσματος του δείγματος = Δραστικότητα του αντίστοιχου προτύπου × A

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

Αν η τιμή της σχετικής δραστικότητας βρίσκεται έξω από τη σειρά των τιμών που περιλαμβάνονται μεταξύ 0,5 και 2,0, ο προσδιορισμός επαναλαμβάνεται ρυθμίζοντας κατάλληλα τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ή, ενδεχόμενα, τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων. Όταν δεν μπορεί να επιτευχθεί σχετική δραστικότης που να βρίσκεται μέσα στα όρια των απαιτουμένων τιμών, το λαμβανόμενο αποτέλεσμα πρέπει να θεωρείται κατά προσέγγιση και αυτό να αναφέρεται στην τελική έκθεση.

Όταν οι ευθείες δεν θεωρούνται παράλληλες, ο προσδιορισμός επαναλαμβάνεται. Αν ποτέ δεν επιτευχθεί παραλληλία ο προσδιορισμός θεωρείται μη ικανοποιητικός.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε χιλιοστόγραμμα σπειραμυκίνης βάσης ανά χιλιόγραμμο ζωοτροφής.

9. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο δείγμα από τον ίδιο αναλυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— 2 mg/kg, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες σε σπειραμυκίνη βάσης έως 10 mg/kg·
— 20 % του υψηλότερου αποτελέσματος για περιεκτικότητες από 10 έως 25 mg/kg·
— 5 mg/kg, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες από 25 έως 50 mg/kg·
— 10 % του υψηλότερου αποτελέσματος για περιεκτικότητες άνω των 50 mg/kg.