384L0425

Nº L 238/34 Diario Oficial de las Comunidades Europeas 6. 9. 84

# DÉCIMA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

**de 25 de julio de 1984**

**por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales**

(84/425/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo de 20 de julio de 1970 relativa a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales (1), modificada en último lugar por el Acta de adhesión de Grecia, y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva citada prevé que los controles oficiales de los alimentos para animales destinados a comprobar que se respetan las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas relativas a la calidad y a la composición de los alimentos para animales se efectuarán según los modos de toma de muestras y los métodos de análisis comunitarios;

Considerando que las Directivas 71/250/CEE (2), 73/46/CEE (3), 74/203/CEE (4), 75/84/CEE (5), 76/372/CEE (6) de la Comisión, modificadas en último lugar por la Directiva 91/680/CEE (7), las Directivas 71/393/CEE (8), 72/199/CEE (9), 78/633/CEE (10), modificadas en último lugar por la Directiva 84/4/CEE (11), así como por la Directiva 81/715/CEE (12), han fijado ya determinados métodos de análisis comunitarios; que, teniendo en cuenta el estado de los trabajos efectuados desde entonces, es conveniente adoptar un nuevo método;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

*Artículo 1*

Los Estados miembros dispondrán que los análisis previstos para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere a su contenido en espiramicina, se efectúen según el método descrito en el Anexo.

*Artículo 2*

Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva a más tardar el 30 de junio de 1985, e informarán de ello a la Comisión.

*Artículo 3*

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 25 de julio de 1984.

*Por la Comisión*

Poul DALSAGER

*Miembro de la Comisión*

(1) DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
(2) DO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.
(3) DO nº L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.
(4) DO nº L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.
(5) DO nº L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.
(6) DO nº L 102 de 15. 4. 1976, p. 8.
(7) DO nº L 246 de 29. 8. 1981, p. 32.
(8) DO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.
(9) DO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.
(10) DO nº L 206 de 29. 7. 1978, p. 43.
(11) DO nº L 15 de 18. 1. 1984, p. 28.
(12) DO nº L 257 de 10. 9. 1981, p. 38.

*ANEXO*

## DETERMINACIÓN DE LA ESPIRAMICINA POR DIFUSIÓN EN MEDIO DE GELOSA

### 1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite determinar la espiramicina en los alimentos y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 1 mg/kg (1 ppm) (1).

### 2. Principio

La muestra se somete a una extracción por una mezcla de metanol y de tampón fosfato-bicarbonato a pH 8. El extracto se decanta o centrifuga, y después se diluye. La actividad antibiótica del extracto se determina midiendo la difusión de la espiramicina en un medio de gelosa, sembrado con *Micrococcus luteus*. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración en antibiótico para la gama de concentraciones utilizadas.

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

3.1. *Mantenimiento de la cepa*

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con *Micrococcus luteus*. Incubar durante 24 horas a 30 °C, conservar en refrigerador a 4 °C aproximadamente y renovar la siembra cada 15 días.

3.2. *Preparación de la suspensión bacteriana* (a)

Recoger los gérmenes en un tubo de gelosa (3.1) de preparación reciente, con ayuda de 2 a 3 ml de solución de cloruro de sodio (4.3). Sembrar con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (4.1) en un matraz de Roux e incubar durante 18 a 20 horas a 30 °C. Recoger los gérmenes en 25 ml de solución de cloruro de sodio (4.3) y homogeneizar. Diluir la suspensión hasta 1/10 con ayuda de la solución de cloruro de sodio (4.3). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro de sodio (4.3), deberá ser de 75 % aproximadamente. Esta suspensión podrá conservarse una semana a 4 °C aproximadamente.

### 4. Medios de cultivo y reactivos

4.1. *Medio de mantenimiento de la cepa* (b)

| | |
|---|---|
| Peptona de carne | 6,0 g |
| Triptona | 4,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| Extracto de carne | 1,5 g |
| Glucosa | 1,0 g |
| Gelosa | 10,0 a 20,0 g |
| Agua | 1 000 ml |

pH 6.5-6.6 (después de la esterilización).

4.2. *Medio de base de la determinación* (b)

| | |
|---|---|
| Triptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 4,0 g |
| Extracto de carne | 3,0 g |
| Gelosa | 10,0 a 20,0 g |
| Agua | 1 000 ml |

pH 8,0 (después de la esterilización).

(1) 1 mg de espiramicina base equivale a 3 200 unidades internales (UI).

(a) Pueden utilizarse otros métodos, en la medida en que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.

(b) Puede utilizarse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga que dé los mismos resultados.

4.3. *Solución a 0,8 % (p/v) de cloruro de sodio*

Disolver en agua 8 g de cloruro de sodio, diluir en 1 000 ml y esterilizar.

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

| | |
|---|---|
| Hidrogenofosfato de potasio, $K_2HPO_4$ | 16,7 g |
| Dihidrogenofosfato de potasio, $KH_2PO_4$ | 0,5 g |
| Carbonato ácido de sodio, $NaHCO_3$ | 20,0 g |
| Agua hasta | 1 000 ml |

4.5. *Mezcla de metanol y de tampón fosfato-bicarbonato* (4.4)

50/50 (v/v).

4.6. *Sustancia patrón*

Espiramicina de actividad conocida (en UI).

5. **Soluciones patrón**

Disolver una cantidad exactamente pesada de la sustancia patrón (4.6) en la mezcla (4.5) y diluir con la misma mezcla para obtener una solución madre a 1 000 UI de espiramicina/ml. Conservada en frasco con tapón esmerilado a 4 °C, esta solución es estable durante 5 días.

Preparar, a partir de esta solución y por diluciones sucesivas con ayuda de la mezcla (4.5), las soluciones siguientes:

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

6. **Preparación del extracto y de las soluciones**

6.1. *Extracción*

Pesar una cantidad de muestra de 20,0 g para los alimentos; de 1,0 a 20,0 g para las premezclas. Añadir 100 ml de mezcla (4.5) y agitar durante 30 minutos. Centrifugar o decantar, diluir después la solución que flota en la superficie con ayuda de la mezcla (4.5) para obtener una concentración supuesta en espiramicina de 1 UI/ml (= $U_8$).

Para los contenidos en espiramicina inferiores a 2,5 mg/kg de alimento, efectuar la extracción como sigue. Pesar una cantidad de muestra de 20,0 g. Añadir 100 ml de mezcla (4.5), agitar durante 30 minutos, centrifugar después durante unos minutos. Tomar 50 ml de la solución que sobrenada y evaporar hasta 4 ml aproximadamente bajo presión reducida en un evaporador giratorio a una temperatura que no sobrepase los 40 °C. Diluir el residuo con ayuda de la mezcla (4.5), para obtener una concentración supuesta en espiramicina de 1 IU/ml (= $U_8$).

6.2. *Soluciones del extracto*

Partiendo de la solución $U_8$, preparar por diluciones sucesivas (1 + 1), con ayuda de la mezcla (4.5), las soluciones $U_4$ (concentración supuesta: 0,5 UI/ml), $U_2$ (concentración supuesta: 0,25 UI/ml) y $U_1$ (concentración supuesta: 0,125 UI/ml).

7. **Modalidades de la determinación**

7.1. *Inoculación del medio de cultivo*

Sembrar a 50 °C aproximadamente el medio de base de la determinación (4.2) con la suspensión bacteriana (3.2). Mediante ensayos preliminares en placas con el medio (4.2), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permite obtener para las diferentes concentraciones en espiramicina zonas de inhibición lo más extensas posibles y que estén todavía limpias.

7.2. *Preparación de las cajas*

La difusión en gelosa se efectúa en unas cajas con cuatro concentraciones de la solución patrón ($S_8$, $S_4$, $S_2$, $S_1$) y las cuatro concentraciones del extracto ($U_8$, $U_4$, $U_2$, $U_1$). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones del patrón y del extracto. A este efecto, hay que elegir las dimensiones de las cajas de forma que se puedan ahuecar en el medio gelosado por lo menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros se hallen a una distancia de por lo menos 30 mm. Como cajas, se pueden utilizar placas de vidrio planas, coronadas con un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cajas una cantidad de medio (4.2), sembrado como se indicó en 7.1, que permita obtener un lecho de 2 mm aproximadamente de espesor (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar que se solidifique, ahuecar las cavidades y depositar volúmenes exactamente medidos de soluciones del patrón y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad, según el diámetro). Realizar por lo menos 4 repeticiones de cada concentración, de modo que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

7.3. *Incubación*

Incubar las cajas durante 16 a 18 horas a 30 °C ± 2 °C.

8. **Evaluación**

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con una precisión de 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico llevando los logaritmos de las concentraciones sobre los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución patrón y para e extracto procediendo, por ejemplo, como sigue.

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución patrón (SL) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución patrón (SH) con ayuda de la fórmula:

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

Determinar de la misma manera los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH) sustituyendo $s_1$, $s_2$, $s_4$ y $s_8$ en las fórmulas antes citadas por $u_1$, $u_2$, $u_4$ y $u_8$ (1).

Llevar los valores SL y SH a la misma gráfica. Uniendo los dos puntos se obtiene de recta más ajustada para la solución patrón. Procediendo del mismo modo para UL y UH se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

So no hay interferencia, las rectas serán paralelas. En la práctica, se las considera paralelas cuando (SH — SL) y (UH — UL) no difieren en más de un 10 % de su media.

Si las rectas no son paralelas, se puede eliminar ya sea $u_1$ y $s_1$ ya sea $u_8$ y $s_8$. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces con ayuda de las fórmulas siguientes:

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

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

y fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a que sean respetados los mismos criterios de paralelismo. La obtención de un resultado procedente de tres niveles debe mencionarse en el boletín de análisis.

(1) Las letras minúsculas «s» y «u» se refieren a los diámetros de las zonas de inhibición.

Cuando las rectas se consideran paralelas, calcular el logaritmo de la actividad relativa (log. A) mediante una de las fórmulas que siguen, según el número de niveles (4 o 3) utilizados para la evaluación del paralelismo.

*Para 4 niveles*

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

*Para 3 niveles*

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

o

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

Actividad del extracto de la muestra = actividad del patrón correspondiente × A:

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

Si la actividad realtiva se encuentra fuera de la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0 repetir la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones de extracto o, eventualmente, de las soluciones patrón. Cuando esta actividad no pueda trasladarse a la gama de valores requeridos, el resultado deberá considerarse aproximado y esta indicación habrá de anotarse en el boletín de análisis.

Cuando las rectas se consideran paralelas, repetir la determinación. Si el paralelismo no se alcanza nunca, la determinación deberá considerarse no satisfactoria.

Expresar el resultado en mg de espiramicina base por kg de alimento.

9. **Repetibilidad**

Las diferencias de los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra por el mismo analita no debe superar:

— 2 mg/kg en valor absoluto, para los contenidos en espiramicina base inferiores a 10 mg/kg;
— el 20 % de resultado más alto para los contenidos de 10 a 25 mg/kg;
— 5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg;
— el 10 % del resultado más alto para los contenidos superiores a 50 mg/kg.