384L0425

Nº L 238/34 Jornal Oficial das Comunidades Europeias 6. 9. 84

DÉCIMA DIRECTIVA DA COMISSÃO

de 25 de Julho de 1984

que estabelece a fixação de métodos de análise comunitários para fiscalização oficial dos alimentos dos animais

(84/425/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 70/373/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de formas de recolha de amostras e de métodos de análise comunitários para a fiscalização oficial da alimentação dos animais (1), com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Grécia e, nomeadamente, o seu artigo 2º,

Considerando que a directiva supra referida preceitua que as análises oficiais de alimentos para animais efectuadas com vista a comprovar se as condições prescritas em consequência das disposições legislativas, regulamentares ou administrativas relativas à qualidade e à composição dos alimentos para animais foram respeitadas devem observar os modos de recolha de amostras e os métodos de análise comunitários;

Considerando que as Directivas 71/250/CEE (2), 73/46/CEE (3), 74/203/CEE (4), 75/84/CEE (5), 76/372/CEE (6) da Comissão, com a última redacção que lhes foi dada pela Directiva 81/680/CEE (7), 78/633/CEE (8), 72/199/CEE (9), 78/633/CEE (10), com a última redacção que lhes foi dada pela Directiva 84/4/CEE (11), assim como a Directiva 81/715/CEE (12), fixaram já um certo número de métodos de análise comunitários; que, tendo em conta o estado de avanço dos trabalhos efectuados desde então, convém adoptar um novo método;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

Os Estados-membros determinarão que as análises previstas para as fiscalizações oficiais dos alimentos para animais, no que diz respeito ao seu teor em espiramicina, sejam efetuadas segundo o método descrito no anexo.

Artigo 2º

Até 30 de Junho de 1985, o mais tardar, os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para darem cumprimento às disposições da presente directiva e do facto informarão a Comissão.

Artigo 3º

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 25 de Julho de 1984.

Pela Comissão

Poul DALSAGER

Membro da Comissão

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

ANEXO

DOSAGEM DA ESPIRAMICINA POR DIFUSÃO EM AGAR

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosear a espiramicina nos alimentos e nas pré-misturas. O limite inferior da dosagem é de 1mg/kg (1ppm) (1).

2. Princípio

Submete-se a amostra a extracção por meio de uma mistura de metanol e de tampão de fosfato-bicarbonato a pH8. Decanta-se ou centrifuga-se, após o que se procede à sua diluição. Determina-se a actividade antibiótica do extracto medindo a difusão da espiramicina em meio de agar inoculado com *Micrococcus luteus*. A difusão revela-se pela formação de zonas de inibição do microorganismo. Considera-se que o diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração de antibiótico para a gama das concentrações utilizadas.

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

3.1. *Conservação da estirpe*

Inoculár o meio de cultura (4.1), em tubos inclinados, com *Micrococcus luteus*. Incubar, durante 24 horas, a 30 °C, conservar no frigorífico a cerca de 4 °C e renovar a inoculação de quinze em quinze dias.

3.2. *Preparação da suspensão bacteriana* (a)

Recolher as bactérias dum tubo de agar (3.1), de preparação recente com 2 a 3 ml de solução de cloreto de sódio (4.3.). Semear, com esta suspensão, 250 ml do meio de cultura (4.1.) num frasco de Roux e incubar durante 18 a 20 horas a 30 °C. Recolher as bactérias em 25 ml de solução de cloreto de sódio (4.3.) e homogeneizar. Diluir a suspensão a 1/10 com a solução de cloreto de sódio (4.3.). A transmissão luminosa da suspensão, medida a 650 mm sob uma espessura de 1 cm, deve ser de 75 % em comparação com a solução de cloreto de sódio (4.3.) Esta suspensão pode ser conservada durante uma semana a cerca de 4 °C.

4. Meio de cultura e reagentes

4.1. *Meio de manutenção da estirpe* (b)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Água	1 000 ml

pH 6.5-6.6 (após esterilização).

4.2. *Meio de base do doseamento* (b)

Triptona	5,0 g
Extracto de levedura	4,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Água	1 000 ml

pH 8,0 (após estirilização).

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

(a) Podem ser utilizados outros métodos desde que seja provado que produzem suspensões bacterinas análogas.

(b) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que dê os mesmos resultados.

4.3. *Solução de 0,8 % (p/v) de cloreto de sódio*

Dissolver em água 8 g de cloreto de sódio, diluir em 1 000 ml e esterilizar.

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

Hidrogenofosfato de potássio, K_2HPO_4	16,7 g
Di-hidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4	0,5 g
Hidrogenocarbonato de sódio, $NaHCO_3$	20,0 g
Água até	1 000 ml

4.5. *Mistura de metanol e de tampão fosfato-bicarbonato* (4.4.)

50/50 (v/v).

4.6. *Substâncias-padrão*

Espiramicina com actividade conhecida (em UI).

5. **Solução-padrão**

Dissolver na mistura (4.5.) uma quantidade da substância-padrão (4.6.) pesada com precisão e diluir com a mesma mistura para obter uma solução-mãe de 1 000 UI de espiramicina/ml. Conservada, em frasco tapado, a 4 °C, esta solução é estável durante cinco dias.

A partir desta solução e por diluições sucessivas, preparar com a mistura (4.5.) as soluções seguintes:

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

6. **Preparação do extracto e das soluções**

6.1. *Extracção*

Pesar uma quantidade de amostra de 20,0 g para os alimentos; de 1,0 a 20,0 g para as pré-misturas. Adicionar 100 ml da mistura (4.5.) e agitar 30 minutos. Centrifugar ou decantar, diluindo seguidamente a solução sobrenadante com a ajuda da mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de espiramicina de 1 UI/ml (= U_8).

Para os teores de espiramicina inferiores a 2,5 mg/kg de alimento, efectuar a extracção como se segue. Pesar uma quantidade de amostra de 20,0 g. Adicionar 100 ml da mistura (4.5.), agitar durante 30 minutos, depois centrifugar durante alguns minutos. Retirar 50 ml da solução sobrenadante e fazer evaporar até cerca de 4 ml a baixa pressão num evaporador rotativo a uma temperatura que não ultrapasse os 40 °C. Diluir o resíduo com a mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de espiramicina de 1 UI/ml (= U_8).

6.2. *Soluções do extracto*

A partir da solução U_8, e por diluições sucessivas (1 + 1), preparar com a mistura (4.5.) as soluções U_4 (concentração teórica: 0,5 UI/ml), U_2 (concentração teórica: 0,25 UI/ml) y U_1 (concentração teórica: 0,125 UI/ml).

7. **Métodos de doseamento**

7.1. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular a cerca de 50 °C o meio de base de doseamento (4.2.) com a suspensão bacteriana (4.2.). Por ensaios preliminares em placas com o meio (4.2.), determinar a quantidade de suspensão bacteriana que permita obter, para as diferentes concentrações em espiramicina, zonas de inibição tão extensas quanto possível ainda nítidas.

7.2. *Preparação das placas*

A difusão em agar efectua-se em placas com as quatro concentrações da solução-padrão (S_8, S_4, S_2, S_1) e as quatro concentrações do extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada placa deve receber necessariamente as quatro concentrações do padrão e do extracto. Para esse efeito, escolher a dimensão das placas de tal maneira que se possa escavar no meio de agar, pelo menos, oito cavidades com 10 a 13 mm, cujos centros não distem entre si menos de 30 mm. Podem utilizar-se, como placas, placas de vidro planas encimadas por um aro de alumínio ou de matéria plástica com 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas placas uma quantidade do meio (4.2.), inoculado como se indica em (7.1.), que permita obter uma camada de cerca de 2 mm de espessura (60 ml para uma placa com 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, escavar as cavidades e depositar nelas os volumes das soluções de padrão e do extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidade, segundo o diâmetro, medidos com precisão). Fazer, pelo menos, quatro repetições de cada concentração, de maneira que cada determinação seja sujeita a uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. *Incubação*

Incubar as placas durante 16 a 18 horas a 30 °C ± 2 °C.

8. **Avaliação**

Medir o diâmetro das zonas de inibição com uma precisão de 0,1 mm. Para cada concentração, registar os valores medios em papel semi-logarítmico com o logaritmo das concentrações em abcissas e os diâmetros de inibição em ordenadas. Ajustar as rectas da solução padrão e do extracto do seguinte modo, por exemplo:

Determinar o ponto mais baixo da recta da solução-padrão (SL) por meio da fórmula:

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

Determinar o ponto mais elevado da recta da solução-padrão (SH) por meio da fórmula:

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

Determinar da mesma maneira o ponto mais baixo (UL) e o ponto mais alto (UH) da recta do extracto, substituindo s_1, s_2, s_4 e s_8 por u_1, u_2, u_4 e u_8 (1) nas fórmulas acima referidas.

Inscrever os valores SL e SH no mesmo gráfico. Unindo dois pontos obtém-se a recta mais ajustada aos dados da solução-padrão. Procedendo da mesma forma para UL, obtém-se a recta mais ajustada aos dados do extracto.

Na ausência de qualquer interferência, as rectas deveriam ser paralelas. Na prática, consideram-se paralelas desde que (SH — SL) e (UH — UL) não se afastem mais de 10 % da sua média.

Se as rectas não forem paralelas podem eliminar-se ou u_1 e s_1 ou u_8 e s_8. Os valores SL, SH, UL e UH que permitem obter as rectas mais ajustadas são então calculados por meio das fórmulas seguintes:

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

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

e fórmulas análogas para UL y UH. A utilização desta alternativa impõe que sejam respeitados os mesmos critérios de paralelismo. A obtenção dum resultado proveniente de três pontos deve ser mencionado no boletim de análise.

(1) As letras minúsculas «s» e «u» referem-se aos diâmetros das zonas de inibição.

Quando as rectas são consideradas paralelas, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por uma das fórmulas seguintes, segundo o número de níveis (4 ou 3) utilizados para a avaliação do paralelismo.

Para 4 pontos

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

Para 3 pontos

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

ou

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

Actividades do extracto da amostra = actividade do padrão correspondente × A:

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

Se a actividade relativa se encontrar fora da gama dos valores compreendidos entre 0,5 e 2,0 repetir a determinação procedendo aos ajustamentos adequados das concentrações do extracto ou, eventualmente, das soluções-padrão. Se não for possível fazer caír essa actividade na gama dos valores requeridos, deverá considerar-se o resultado aproximado e esta indicação será anotada no boletim de análise. Quando se considerar que as rectas não são paralelas, repetir a determinação. Se o paralelismo voltar a não se verificar, a determinação deverá ser considerada como não satisfatória.

Exprimir o resultado em miligramas de espiramicina-base por quilogramas de alimento.

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas sobre a mesma amostra pelo mesmo analista não deverá ultrapassar:

— 2 mg/kg em valor absoluto, para os teores em espiramicina-base inferiores a 10 mg/kg,
— 20 % do resultado mais elevado para os teores de 10 a 25 mg/kg,
— 5 mg/kg em valor absoluto, para os teores de 25 a 50 mg/kg,
— 10 % do resultado mais elevado para os teores superiores a 50 mg/kg.