31984L0425

DESÁTÁ SMĚRNICE KOMISE
ze dne 25. července 1984,
kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(84/425/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970, kterou se zavádějí metody odběru vzorků a analýzy Společenství pro úřední kontrolu krmiv [1], naposledy pozměněnou Aktem o přistoupení Řecka, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že uvedená směrnice požaduje, aby úřední kontrola krmiv za účelem kontroly dodržování požadavků ustanovení právních a správních předpisů týkajících se kvality a složení krmiv byla prováděna za použití metod Společenství pro odběr vzorků a analýzu;

vzhledem k tomu, že směrnice Komise 71/250/EHS [2], 73/46/EHS [3], 74/203/EHS [4], 75/84/EHS [5], 76/372/EHS [6] naposledy pozměněné směrnicí 81/680/EHS [7], směrnice 71/393/EHS [8], 72/199/EHS [9], 78/633/EHS [10] naposledy pozměněné směrnicí 84/4/EHS [11] a směrnice 81/715/EHS [12] již stanovily určitý počet analytických metod Společenství; že pokrok v práci od té doby činí účelným přijmout novou metodu;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontrolu krmiv, pokud jde o jejich obsah spiramycinu, se provádějí metodou popsanou v příloze.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 30. června 1985 a neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 25. července 1984.

Za Komisi

Poul DALSAGER

člen Komise

---

(1) Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.
(2) Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.
(3) Úř. věst. L 83, 30.3.1973, s. 21.
(4) Úř. věst. L 108, 22.4.1974, s. 7.
(5) Úř. věst. L 32, 5.2.1975, s. 26.
(6) Úř. věst. L 102, 15.4.1976, s. 8.
(7) Úř. věst. L 246, 29.8.1981, s. 32.
(8) Úř. věst. L 279, 20.12.1971, s. 7.
(9) Úř. věst. L 123, 29.5.1972, s. 6.
(10) Úř. věst. L 206, 29.7.1978, s. 43.
(11) Úř. věst. L 15, 18.1.1984, s. 28.
(12) Úř. věst. L 257, 10.9.1981, s. 38.

PŘÍLOHA

STANOVENÍ SPIRAMYCINU DIFÚZÍ NA AGAROVÉM MÉDIU

1. Účel a rozsah

Metoda je určena pro stanovení spiramycinu v krmivech a premixech. Dolní mez stanovitelnosti je 1 mg/kg (1 ppm) ([1])

2. Princip

Vzorek se extrahuje směsí metanol/fosfát-bikarbonátovým pufrem o pH 8. Extrakt je dekantován nebo odstředěn a zředěn. Jeho antibiotická aktivita je stanovena měřením difúze spiramyscinu v agarovém médiu inokulovaném mikroorganizmem *Micrococcus luteus*. Difúze se projevuje tvorbou inhibičních zón mikroorganizmu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu antibiotické koncentrace nad rozsah použitých antibiotických koncentrací.

3. Mikroorganizmus: *Micrococcus luteus* ATC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1 *Udržování základní kultury*

Naočkujte kultivační médium (4.1) v šikmé zkumavce mikroorganizmem *Micrococcus luteus* a inkubujte 24 hodin při 30 °C. Kulturu skladujte v chladničce při teplotě okolo 4 °C. Znovu naočkujte každé dva týdny.

3.2 *Příprava bakteriální suspenze* ([a])

Ze dříve připraveného šikmého agaru smyjte bakterie 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Tuto suspenzi použijte k naočkování 250 ml kultivačního média (4.1) obsaženého v Rouxově baňce a inkubujte 18 až 20 hodin při 30 °C. Bakterie smyjte do 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a promíchejte. Zřeďte suspenzi na 1/10 roztokem chloridu sodného (4.3). Světelná transmise suspenze musí být okolo 75 %, měřeno při 650 nm v 1 cm kyvetě proti roztoku chloridu sodného (4.3.). Tato suspenze může být skladována jeden týden při asi 4 °C.

4. Kultivační média a činidla

4.1 *Kultivační médium* ([b])

Masový pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Extrakt z kvasnic	3,0 g
Extrakt z masa	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml

PH 6,5 až 6,6 (po sterilizaci).

4.2 *Zkušební médium* ([b])

Trypton	5,0 g
Extrakt z kvasnic	4,0 g
Extrakt z masa	3,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml

PH 8,0 (po sterilizaci).

([1]) 1 mg báze spiramycinu je ekvivalentem 3 200 mezinárodních jednotek (IU).

([a]) Další metody mohou být použity za předpokladu, že bylo stanoveno, že poskytují podobné bakteriální suspenze.

([b]) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

4.3 *Roztok chloridu sodného 0,8 % (váhově objemový)*

Rozpusťte 8 g chloridu sodného ve vodě a zřeďte do 1 000 ml; sterilizujte.

4.4 *Fosfát-bikarbonátový pufr, pH 8,0*

Dihydrogen fosforečnan dvou draselný K_2HPO_4	16,7 g
Hydrogen fosforečnan draselný KH_2PO_4	0,5 g
Hydrogen uhličitan sodný $NaHCO_3$	20,0 g
Voda do	1 000 ml

4.5 *Směs metanol fosfát-bikarbonátový pufr (4.4)*

50/50 (objemově).

4.6 *Standardní látka*

Spiramycin o známé aktivitě (v IU).

5. **Standardní roztoky**

Rozpusťte přesně odvážené množství standardní látky (4.6.) ve směsi (4.5.) a zřeďte stejnou směsí, abyste obdrželi zásobní roztok obsahující 1 000 IU spiramycinu na mililitr. Skladován v zazátkované láhvi při 4 °C je tento roztok stabilní až pět dní.

Z tohoto zásobního roztoku připravte postupným ředěním směsí (4.5.) následující roztoky:

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

6. **Příprava extraktu a zkušebních roztoků**

6.1 *Extrakce*

Odvažte 20,0 g vzorku v případě krmiv, 1,0 až 20,0 g u premixů. Přidejte 100 ml směsi (4.5) a třepejte 30 minut. Odstřeďte nebo dekantujte a zřeďte roztok supernatantu směsí (4.5), abyste obdrželi očekávaný obsah spiramycinu 1 IU/ml (= U_8).

Pro očekávané obsahy spiramycinu menší než 2,5 mg/kg krmiva, musí být extrakce provedena následovně. Odvažte 20,0 g vzorku. Přidejte 100 ml směsi (4.5) a třepejte 30 minut. Odstřeďujte několik minut, odeberte 50 ml roztoku supernatantu a odpařte na asi 4 ml za sníženého tlaku na rotační odparce při teplotě nepřesahující 40 °C. Zřeďte zbytek směsí (4.5), abyste obdrželi očekávaný obsah spiramycinu 1 IU/ml (= U_8).

6.2 *Zkušební roztoky*

Z roztoku U_8 připravte roztokU_4 (očekávaný obsah: 0,5 IU/ml), U_2 (očekávaný obsah: 0,25 IU/ml) a U_1 (očekávaný obsah: 0,125 IU/ml) pomocí postupného ředění (1 + 1) směsí (4.5).

7. **Zkušební postup**

7.1 *Naočkování zkušebního média*

Naočkujte zkušební médium (4.2) bakteriální suspenzí (3.2) při asi 50 °C. Předběžnými pokusy na miskách se zkušebním médiem (4.2) stanovte požadované množství bakteriální suspenze, které poskytne největší a nejjasnější inhibiční zóny s různými koncentracemi spiramycinu.

7.2 *Příprava misek*

Difúze agarem se provádí na miskách se čtyřmi koncentracemi standardního roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a čtyřmi koncentracemi zkušebního roztoku (U_8, U_4, U_2, U_1). Tyto čtyři koncentrace extraktu a standardu musí být nutně umístěny na každé misce. Pro tento účinek vyberte misky dostatečně velké, aby umožňovaly udělat v agarovém médiu nejméně osm otvorů s průměrem 10 až 13 mm a nejméně 30 mm mezi středy. Pokus může být proveden na miskách skládajících se z tabule skla s kroužkem z hliníku nebo plastu umístěným na vrchu, 200 mm v průměru a 20 mm vysokým.

Rozlijte na misky množství média (4.2.), inokulovaného jako v 7.1., aby vytvořilo vrstvu asi 2 mm silnou (60 ml na desku o průměru 200 ml). Nechejte ustát, vytvořte otvory a umístěte do nich přesně odměřené objemy zkušebních a standardních roztoků (mezi 0,10 a 0,15 ml na otvor, podle průměru). Použijte každou koncentraci nejméně čtyřikrát tak, že každé stanovení zahrnuje vyhodnocení 32 inhibičních zón.

7.3 *Inkubace*

Inkubujte misky 16 až 18 hodin při 30 ± 2 °C.

8. **Vyhodnocení**

Změřte průměr inhibičních zón s přesností na 0,1 mm. Zaznamenejte střední rozměry pro každou koncentraci na semilogaritmický grafický papír, při čemž vynášejte logaritmus koncentrací ve vztahu k průměrům inhibičních zón. Utvořte nejvhodnější křivky standardního roztoku a extraktu, například jak je níže uvedeno.

Stanovte „nejvhodnější“ bod pro standardní nejnižší úroveň (SL) s použitím rovnice:

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

Stanovte „nejvhodnější“ bod pro standardní nejvyšší úroveň (SH) s použitím rovnice:

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

Podobně vypočítejte „nejvhodnější“ body pro nejnižší úroveň extraktu (UL) a nejvyšší úroveň extraktu (UH) nahrazením u_1, u_2, u_4 a u_8 za s_1, s_2, s_4, a s_8 v dříve uvedených rovnicích [1]

Zaznamenejte vypočtené hodnoty SL a SH na stejný grafický papír a spojte je tak, abyste dostali „nejhodnější“ křivku pro standardní roztok. Podobně zaznamenejte UL a UH a spojte je tak, abyste dostali „nejvhodnější“ křivku pro extrakt.

V nepřítomnosti jakéhokoli ovlivnění by křivky měly být paralelní. Pro praktické účely mohou být křivky považovány za paralelní, pokud hodnoty (SH — SL) a (UH — UL) nekolísají více než o 10 % od jejich střední hodnoty.

Pokud jsou křivky neparalelní, buď u_1 a s_1 nebo u_8 a s_8, mohou být vyřazeny a SL, SH, UL a UH vypočteny s použitím alternativních rovnic, aby poskytly alternativní „nejvhodnější“ křivky:

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

b′) $$SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

a podobně pro UL a UH. Měla by být splněna stejná kritéria paralelnosti. Skutečnost, že byl výsledek vypočítán ze tří úrovní, musí být zaznamenána v závěrečném protokolu o analýze.

[1] Malá písmena „s“ a „u“ odpovídají průměrům inhibičních zón.

Pokud jsou křivky považovány za paralelní, vypočtěte logaritmus relativní aktivity (log A) s pomocí jedné z následujících rovnic, v závislosti na tom, zdali byly použity tři nebo čtyři úrovně pro ohodnocení paralelnosti.

Pro čtyři úrovně

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

Pro tři úrovně

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

nebo

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

Aktivita extraktu vzorku = aktivita příslušného standardu × A

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

Pokud byla relativní aktivita nalezena mimo rozsah 0,5 až 2,0, potom opakujte zkoušku, při čemž proveďte vhodné úpravy koncentrací extraktu nebo, pokud toto není možné, roztoků standardu. Pokud nemůže být relativní aktivita zařazena do požadovaného rozsahu, musí být každý získaný výsledek považován za přibližný a toto musí být uvedeno v závěrečném protokolu o analýze.

Pokud jsou křivky považovány za neparalelní, opakujte stanovení. Pokud není stále docíleno paralelnosti, stanovení musí být považováno za neuspokojivé.

Vyjádřete výsledek v miligramech báze spiramycinu na kilogram krmiva.

9. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku stejným analytikem nesmí překročit:

— 2 mg/kg v absolutní hodnotě pro obsahy báze spiramycinu do 10 mg/kg,

— 20 % vzhledem k nejvyšší hodnotě pro obsahy 10 až 25 mg/kg,

— 5 mg/kg v absolutní hodnotě pro obsahy 25 až 50 mg/kg,

— 10 % vzhledem k nejvyšší hodnotě pro obsahy nad 50 mg/kg.