31984L0425

KÜMNES KOMISJONI DIREKTIIV, 25. juuli 1984, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid loomasööda ametlikuks kontrolliks

(84/425/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi 70/373/EMÜ sööda ametlikuks kontrolliks vajalike ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta, [1] viimati muudetud Kreeka ühinemisaktiga, eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

eespool nimetatud direktiivi kohaselt tuleb loomasööda kvaliteeti ja koostist reguleerivates õigusnormides sätestatud nõuetele vastavust ametlikult kontrollida ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite abil;

komisjoni direktiivides 71/250/EMÜ, [2] 73/46/EMÜ, [3] 74/203/EMÜ, [4] 75/84/EMÜ [5] ja 76/372/EMÜ, [6] viimati muudetud direktiiviga 81/680/EMÜ, [7] direktiivides 71/393/EMÜ, [8] 72/199/EMÜ [9] ja 78/633/EMÜ, [10] viimati muudetud direktiiviga 84/4/EMÜ [11] ning direktiivis 81/715/EMÜ [12] on juba kehtestatud mitmed ühenduse analüüsimeetodid; vahepeal saavutatud edusammude tõttu on soovitatav vastu võtta uus meetod;

käesoleva direktiiviga ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid nõuavad, et analüüsid loomasööda spiramütsiinisisalduse ametlikuks kontrollimiseks teostatakse vastavalt lisas kirjeldatud meetodile.

Artikkel 2

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 30. juunil 1985. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 25. juuli 1984

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Poul DALSAGER

---

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

LISA

SPIRAMÜTSIINI MÄÄRAMINE AGARSÖÖTMEL DIFUSIOONI TEEL

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesoleva meetodiga määratakse spiramütsiini sisaldus söötades ja eelsegudes. Alumine määramispiir on 1 mg/kg (1 miljondik) ([1]).

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse metanooli/fosfaat-vesinikkarbonaatpuhvri seguga (pH 8). Ekstrakt dekanteeritakse või tsentrifuugitakse ning lahjendatakse. Ekstrakti antibiootilise aktiivsuse määramiseks mõõdetakse spiramütsiini difusioon agarsöötmel, mis on nakatatud *Micrococcus luteus*'ega. Difusiooni näitab mikroorganismi inhibitsioonitsoonide tekkimine. Nimetatud tsoonide läbimõõtu käsitatakse otseselt võrdelisena antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmiga kasutatud antibiootikumikontsentratsioonide vahemikus.

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

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

Söödet (4.1) sisaldavad längagariga katseklaasid nakatatakse *Micrococcus luteus*'ega ja inkubeeritakse 30 °C juures 24 tundi. Kultuuri säilitatakse külmikus umbes 4 °C juures. Söödet nakatatakse uuesti iga kahe nädala järel.

3.2. *Bakterisuspensiooni valmistamine* ([a])

Hiljuti valmistatud längagarilt (3.1) kogutakse kultuur 2–3 ml naatriumkloriidi lahusesse (4.3). Saadud suspensiooniga nakatatakse Roux' anumas 250 ml söödet (4.1) ning inkubeeritakse 30 °C juures 18–20 tundi. Kasvukultuur kogutakse 25 ml naatriumkloriidi lahusesse (4.3) ja segatakse. Suspensiooni lahjendatakse naatriumkloriidi lahusega (4.3) vahekorras 1 : 10. Suspensiooni valgusläbivus peab olema ligikaudu 75 % naatriumkloriidi lahuse (4.3) valgusläbivusest, mõõdetuna 650 nm juures küvetis läbimõõduga 1 cm. Suspensiooni võib hoida külmikus umbes 4 °C juures ühe nädala.

4. Söötmed ja reaktiivid

4.1. *Sööde* ([b])

Lihapeptoon	6,0 g
Trüptoon	4,0 g
Pärmiekstrakt	3,0 g
Lihaekstrakt	1,5 g
Glükoos	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vesi	1 000 ml
pH 6,5–6,6 (pärast steriliseerimist)	

4.2. *Analüüsi sööde* ([b])

Trüptoon	5,0 g
Pärmiekstrakt	4,0 g
Lihaekstrakt	3,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Vesi	1 000 ml
pH 8,0 (pärast steriliseerimist)	

([1]) 1 mg spiramütsiini vastab 3 200 rahvusvahelisele ühikule (RÜ).
([a]) Kasutada võib ka teisi meetodeid, kui on kindlaks tehtud, et nendega saadakse sarnased bakterisuspensioonid.
([b]) Kasutada võib müügilolevat söödet, mis on samalaadse koostisega ning millega saadakse samad tulemused.

4.3. *0,8 (massi/mahu)protsendiline naatriumkloriidi lahus*

8 g naatriumkloriidi lahustatakse vees ja lahjendatakse 1 000 milliliitrini. Lahus steriliseeritakse.

4.4. *Fosfaat-vesinikkarbonaatpuhverlahus, pH 8,0*

Dikaaliumvesinikfosfaat K_2HPO_4	16,7 g
Kaaliumdivesinikfosfaat KH_2PO_4	0,5 g
Naatriumvesinikkarbonaat $NaHCO_3$	20,0 g

Lisatakse vett 1 000 ml lahuse saamiseks.

4.5. *Metanooli/fosfaat-bikarbonaatpuhvri (4.4) segu*

Mahuvahekorras 50/50.

4.6. *Standardaine*

Teadaoleva aktiivsusega spiramütsiin (RÜ).

5. **Standardlahused**

Standardaine (4.6) täpne kaalutis lahustatakse segus (4.5) ja lahjendatakse sama seguga, kuni saadakse põhilahus, mis sisaldab 1 000 RÜ spiramütsiini milliliitri kohta. See lahus säilib suletud kolvis 4 °C juures stabiilsena kuni viis päeva.

Kõnealusest põhilahusest valmistatakse seguga (4.5) järjest lahjendades järgmised lahused:

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

6. **Ekstrakti ja testlahuste valmistamine**

6.1. *Ekstraheerimine*

Võetakse sööda proovi 20,0 g kaalutis või eelsegu 1,0–20,0 g kaalutis, lisatakse 100 ml segu (4.5) ja loksutatakse 30 minutit. Tsentrifuugitakse või dekanteeritakse ning supernatant lahjendatakse seguga (4.5), kuni saadakse eeldatav spiramütsiini kontsentratsioon 1 RÜ/ml (= U_8).

Kui spiramütsiini eeldatav sisaldus söödas on madalam kui 2,5 mg/kg, tuleb ekstraheerimine läbi viia järgmiselt: võetakse loomasööda proovi 20,0 g kaalutis, lisatakse 100 ml segu (4.5) ja loksutatakse 30 minutit. Tsentrifuugitakse mõned minutid, võetakse 50 ml supernatanti ja aurustatakse vaakumpöördaurustis temperatuuril kuni 40 °C, kuni järele jääb 4 ml lahust. Eeldatava spiramütsiini kontsentratsiooni 1 RÜ/ml (= U_8) saamiseks lahjendatakse jääk seguga (4.5).

6.2. *Testlahused*

Lahusest U_8 valmistatakse lahused U_4 (eeldatav sisaldus 0,5 RÜ/ml), U_2 (eeldatav sisaldus 0,25 RÜ/ml) ja U_1 (eeldatav sisaldus 0,125 RÜ/ml), lahjendades seda järjest (vahekorras 1 : 1) seguga (4.5).

7. **Analüüsi käik**

7.1. *Analüüsi söötme nakatamine*

Analüüsi sööde (4.2) nakatatakse bakterisuspensiooniga (3.2) umbes 50 °C juures. Analüüsi söötmega (4.2) tassidel teostatavate eelkatsete käigus määratakse kindlaks bakterisuspensiooni kogus, mis on vajalik suurimate ja selgeimate inhibitsioonitsoonide saamiseks spiramütsiini eri kontsentratsioonide juures.

7.2. *Tasside ettevalmistamine*

Difusioon agarsöötmel viiakse läbi tassidel, kasutades nelja erineva kontsentratsiooniga standardlahust (S_8, S_4, S_2 ja S_1) ja nelja erineva kontsentratsiooniga testlahust (U_8, U_4, U_2 ja U_1). Iga tassi puhul tuleb tingimata kasutada kõiki nelja ekstrakti ja standardlahust. Selleks valitakse tassid, mis on piisavalt suured, et agarsöötmesse oleks võimalik teha vähemalt kaheksa 10–13 mm läbimõõduga auku, mille keskmed jäävad üksteisest vähemalt 30 mm kaugusele. Katse võib läbi viia klaasplaadil, millele on asetatud alumiinium- või plastrõngas läbimõõduga 200 mm ja kõrgusega 20 mm.

Tassidele valatakse teatav kogus söödet (4.2), mis on nakatatud vastavalt punktile 7.1, nii et tekiks ligikaudu 2 mm paksune kiht (200 mm läbimõõduga plaadi puhul 60 ml). Söötmel lastakse tasanduda, sellesse tehakse augud ning nendesse lisatakse täpselt mõõdetud test- ja standardlahuste kogused (0,10–0,15 ml augu kohta olenevalt läbimõõdust). Iga erineva kontsentratsiooniga lahust kasutatakse vähemalt neli korda, et iga määramisega oleks võimalik hinnata 32 inhibitsioonitsooni.

7.3. *Inkubatsioon*

Tasse inkubeeritakse 30 ± 2 °C juures 16–18 tundi.

8. **Hindamine**

Inhibitsioonitsoonide läbimõõt määratakse 0,1 mm täpsusega. Iga kontsentratsiooni puhul kantakse keskmised väärtused poollogaritmilisele millimeetripaberile, kus on näha kontsentratsioonide logaritmi ja inhibitsioonitsoonide läbimõõdu vaheline seos. Nii standardlahuse kui ka ekstrakti jaoks visandatakse kõige sobivamad jooned, näiteks nagu kirjeldatud allpool.

Standardlahuse madalaima taseme (SL) jaoks määratakse "kõige sobivam" punkt, kasutades järgmist valemit:

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

Standardlahuse kõrgeima taseme (SH) jaoks määratakse "kõige sobivam" punkt, kasutades järgmist valemit:

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

Samal viisil arvutatakse "kõige sobivamad" punktid ekstrakti madalaima taseme (UL) ja ekstrakti kõrgeima taseme (UH) jaoks, asendades s_1, s_2, s_4 ja s_8 eespool toodud valemis u_1, u_2, u_4 ja u_8–ga [1].

Arvutatud SL ja SH väärtused märgitakse samale millimeetripaberile ja nende ühendamisel saadakse standardlahuse "kõige sobivam" joon. Samal viisil märgitakse UL ja UH ning nende ühendamisel saadakse ekstrakti "kõige sobivam" joon.

Häirivate mõjude puudumisel peaksid saadud jooned olema paralleelsed. Praktiliselt võib jooni käsitada paralleelsetena, kui väärtused (SH–SL) ja (UH–UL) ei erine vastavatest keskmistest väärtustest rohkem kui 10 % võrra.

Kui jooned ei ole paralleelsed, võib ära jätta kas u_1 ja s_1 või u_8 ja s_8 ning arvutada SL, SH, UL ja UH järgmiste valemite abil, mille põhjal saadakse alternatiivsed "kõige sobivamad" jooned:

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

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

Samal viisil leitakse UL ja UH. Sarnaselt eespool kirjeldatuga tuleb kontrollida alternatiivsete "kõige sobivamate" joonte paralleelsust. Lõpparuandes tuleb ära märkida asjaolu, et tulemus on arvutatud kolme kontsentratsiooni põhjal.

[1] Väikesed tähed "s" ja "u" tähistavad inhibitsioonitsoonide läbimõõte.

Kui jooni käsitatakse paralleelsetena, arvutatakse suhtelise aktiivsuse logaritm (log A) ühe järgmise valemi abil.

Nelja kontsentratsiooni puhul:

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

Kolme kontsentratsiooni puhul:

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

või

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

Testitava ekstrakti aktiivsus = vastava standardi aktiivsus × A

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

Kui suhteline aktiivsus jääb väljapoole vahemikku 0,5–2,0, korratakse katset, kohandades vastavalt vajadusele ekstrakti kontsentratsioone või vastava võimaluse puudumisel standardlahuste kontsentratsiooni. Kui ei ole võimalik saavutada suhtelise aktiivsuse jäämist nõutud vahemikku, tuleb kõiki saadud tulemusi käsitada ligikaudsetena ning see tuleb lõpparuandes ära märkida.

Kui jooni ei saa käsitada paralleelsetena, korratakse määramist. Kui ka kordusmääramisel ei saavutata paralleelsust, tuleb määramine lugeda mitterahuldavaks.

Tulemus väljendatakse spiramütsiini milligrammides ühe kilogrammi loomasööda kohta.

9. **Korratavus**

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohiks ületada:

— 2 mg/kg, kui spiramütsiini sisaldus on kuni 10 mg/kg,

— 20 % suurimast väärtusest, kui spiramütsiini sisaldus on 10–25 mg/kg,

— 5 mg/kg, kui spiramütsiini sisaldus on 25–50 mg/kg,

— 10 % suurimast väärtusest, kui spiramütsiini sisaldus on üle 50 mg/kg.