31984L0425

A BIZOTTSÁG TIZEDIK IRÁNYELVE
(1984. július 25.)
a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról

(84/425/EGK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb Görögország csatlakozási okmányával módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i 70/373/EGK [1] tanácsi irányelvre és különösen annak 2. cikkére,

mivel az említett irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja a takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani;

mivel a legutóbb a 81/680/EGK [2] irányelvvel módosított 71/250/EGK [3], a 73/46/EGK [4], a 74/203/EGK [5], a 75/84/EGK [6], a 76/372/EGK [7] bizottsági irányelvek, a legutóbb a 84/4/EGK [8] irányelvvel módosított 71/393/EGK [9], a 72/199/EGK [10], a 78/633/EGK [11] irányelvek, valamint a 81/715/EGK [12] irányelv már számos közösségi analitikai módszert meghatározott; mivel az azóta eltelt időben, az adott területen elért fejlődés következtében célszerű egy új módszer elfogadása;

mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottságának véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok spiramicin tartalmára vonatkozó hatósági ellenőrzések során végzett analitikai vizsgálatokat a mellékletben leírt módszernek megfelelően kell végrehajtani.

2. cikk

A tagállamok legkésőbb 1985. június 30-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek, és erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

3. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1984. július 25-én.

a Bizottság részéről

Poul DALSAGER

a Bizottság tagja

---

(1) HL L 170., 1970.8.3., 2. o.
(2) HL L 246., 1981.8.29., 32. o.
(3) HL L 155., 1971.7.12., 13. o.
(4) HL L 83., 1973.3.30., 21. o.
(5) HL L 108., 1974.4.22., 7. o.
(6) HL L 32., 1975.2.5., 26. o.
(7) HL L 102., 1976.4.15., 8. o.
(8) HL L 15., 1984.1.18., 28. o.
(9) HL L 279., 1971.12.20., 7. o.
(10) HL L 123., 1972.5.29., 6. o.
(11) HL L 206., 1978.7.29., 43. o.
(12) HL L 257., 1981.9.10., 38. o.

MELLÉKLET

A SPIRAMICIN DIFFÚZIÓVAL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA AGAR TÁPTALAJBAN

1. Cél és alkalmazási terület

A módszer a spiramicin takarmányokban és előkeverékekben történő meghatározására szolgál. A meghatározás alsó méréshatára 1 mg/kg (1 ppm) ([1]).

2. Vizsgálati alapelv

A mintát metil-alkohol/foszfát-bikarbonát puffer pH 8-as keverékével extraháljuk. A kivonatot dekantáljuk vagy centrifugáljuk és hígítjuk. Antibiotikus aktivitását a spiramicin *Micrococcus luteus*sal beoltott agar táptalajon végbemenő diffúziójának mérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus gátlási zónáinak képződése jelzi. Ezen zónák átmérője egyenes arányban áll az antibiotikum koncentrációnak az alkalmazott antibiotikum koncentrációk tartománya feletti logaritmusával.

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

3.1. *A törzstenyészet fenntartása*

Oltsunk be ferde táptalajokat (4.1) tartalmazó csöveket *Micrococcus luteus*sal, majd inkubáljuk 30 °C-on 24 órán át. A tenyészetet hűtőgépben tároljuk 4 °C körüli hőmérsékleten. Kéthetenként oltsuk át.

3.2. *A baktérium-szuszpenzió elkészítése* ([a])

2–3 ml nátrium-klorid oldat (4.3) segítségével gyűjtsük be egy nemrégiben elkészített ferde agarról (3.1) a növekményt. Ezzel a szuszpenzióval oltsunk be 250 ml, Roux lombikban lévő táptalajt (4.1) és inkubáljuk 30 °C-on 18-20 órán át. Gyűjtsük be a növekményt 25 ml nátrium-klorid oldatban (4.3), majd keverjük össze. Hígítsuk fel a szuszpenziót nátrium-klorid oldattal (4.3) 1/10 arányban. A szuszpenziónak 650 nm-en, 1 cm-es cellában nátrium-klorid oldat (4.3) ellenében mért fényáteresztő képessége 75 % körüli kell, hogy legyen. Ez a szuszpenzió 4 °C körüli hőmérsékleten egy hétig tárolható.

4. Táptalajok és reagensek

4.1. *Alap táptalaj* ([b])

Hús pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Élesztőkivonat	3,0 g
Húskivonat	1,5 g
Glükóz	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Víz	1 000 ml
pH 6,5- 6,6 (sterilizálás után)	

4.2. *Vizsgálati táptalaj* ([b])

Tripton	5,0 g
Élesztőkivonat	4,0 g
Húskivonat	3,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Víz	1 000 ml
pH 8,0 (sterilizálás után)	

([1]) 1 mg spiramycin bázis 3 200 nemzetközi egységnek (NE) felel meg.

([a]) Más módszerek is alkalmazhatók feltéve, hogy megállapítást nyert, hogy azok hasonló baktérium szuszpenziókat eredményeznek.

([b]) Minden hasonló összetételű és ugyanezeket az eredményeket adó kereskedelmi táptalaj felhasználható.

4.3. *0,8 %-os (w/v) nátrium-klorid oldat*

Vízben oldjunk fel 8 g nátrium-kloridot, majd hígítsuk 1 000 ml-re; sterilizáljuk.

4.4. *Foszfát-bikarbonát puffer, pH 8,0*

Dikálium-hidrogén-foszfát K_2HPO_4	16,7 g
Kálium-dihidrogén-foszfát KH_2PO_4	0,5 g
Nátrium-hidrogén-karbonát $NaHCO_3$	20,0 g
Vízzel kiegészítve	1 000 ml-re

4.5. *Metilalkohol/foszfát-bikarbonát puffer keverék (4.4)*

50/50 (v/v).

4.6. *Standard anyag*

Ismert aktivitású spiramicin (NE-ben).

5. **Standard oldatok**

Oldjuk fel a standard anyag (4.6) pontosan kimért mennyiségét a keverékben (4.5) majd hígítsuk fel ugyanazzal a keverékkel, hogy egy 1 000 NE/ml spiramicint tartalmazó törzsoldatot kapjunk. Lezárt lombikban 4 °C-on tárolva az oldat 5 napig eltartható.

A törzsoldatnak a keverékkel (4.5) történő többszöri hígításával készítsük el a következő oldatokat:

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

6. **A kivonat- és vizsgálati oldatok elkészítése**

6.1. *Extrakció*

Mérjünk ki takarmányok esetében 20,0 g, előkeverékek esetében 1,0–20,0 g mintát. Adjunk hozzá 100 ml-t a keverékből (4.5), majd rázzuk 30 percig. Centrifugáljuk vagy dekantáljuk, majd a felülúszó oldatot hígítsuk fel a keverékkel (4.5), hogy megközelítőleg 1 NE/ml spiramicin-tartalmat (= U_8) kapjunk.

Azoknál a takarmányoknál, ahol a várható spiramicinszintek 2,5 mg/kg-nál alacsonyabbak, ott az extrakciót a következők szerint kell elvégezni: mérjünk ki 20 g mintamennyiséget. Adjunk hozzá 100 ml-t a keverékből (4.5), majd rázzuk 30 percig. Centrifugáljuk néhány percig, vegyünk ki a felülúszó oldatból 50 ml-t és azt egy rotációs bepárlókészülékben, csökkentett nyomáson, 40 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten pároljuk be körülbelül 4 ml-re. A maradékot hígítsuk fel a keverékkel (4.5), hogy megközelítőleg 1 NE/ml spiramicin-tartalmat (= U_8) kapjunk.

6.2. *Vizsgálati oldatok*

Az U_8 oldatnak a keverékkel (4.5) történő többszöri hígításával (1 + 1) készítsünk U_4 (várható tartalom: 0,5 NE/ml), U_2 (várható tartalom: 0,25 NE/ml) és U_1 (várható tartalom: 0,125 NE/ml) oldatokat.

7. **A vizsgálat módja**

7.1. *A vizsgálati táptalaj beoltása*

Oltsuk be a vizsgálati táptalajt (4.2) a baktérium-szuszpenzióval (3.2), körülbelül 50 °C-on. A vizsgálati táptalajt (4.2) tartalmazó lemezeken végzett előzetes vizsgálatok segítségével határozzuk meg azt a szükséges baktérium-szuszpenzió mennyiséget, amely a különböző spiramicin koncentrációkkal a legnagyobb és legtisztább gátlási zónákat adja.

7.2. *A lemezek elkészítése*

Az agardiffúziót a négy standard oldat koncentrációval (S_8, S_4, S_2, S_1) és a négy vizsgálati oldat koncentrációval (U_8, U_4, U_2, U_1) öntött lemezeken végezzük. A standardnak és a kivonatnak ezt a négy-négy koncentrációját minden egyes lemezen el kell helyezni. Ennek érdekében megfelelő nagyságú lemezeket kell választanunk ahhoz, hogy az agar táptalajon legalább nyolc darab, 10-13 mm átmérőjű, egymástól legalább 30 mm távolságra lévő lyukakat fúrhassunk. A vizsgálat olyan lemezeken végezhető el, amelyek egy üveglapból és egy 200 mm átmérőjű és 20 mm magas csiszolt alumínium vagy műanyag karimagyűrűből állnak.

A lemezekre öntsünk annyi, a 7.1 pont szerint beoltott táptalajt (4.2), hogy az egy körülbelül 2 mm vastagságú réteget képezzen (200 mm átmérőjű lemez esetében ez 60 ml). Hagyjuk egyenletesen eloszlani, fúrjuk ki a lyukakat és helyezzük el bennük a vizsgálati és standard oldatok pontosan kimért mennyiségeit (az átmérő függvényében lyukanként 0,10 és 0,15 ml között). Minden koncentrációt legalább négy alkalommal alkalmazzunk, hogy minden meghatározás 32 gátlási zóna értékelésén alapuljon.

7.3. *Inkubálás*

Inkubáljuk a lemezeket 30 ± 2 °C-on, 16-18 órán át.

8. **Kiértékelés**

A gátlási zónák átmérőjét 0,1 mm-es pontossággal mérjük meg. Fél-logaritmikus milliméterpapírra jegyezzük fel minden koncentrációnál a mérések középértékeit, jelezve a koncentrációknal a gátlási zónák átmérőihez viszonyított logaritmusát. Szerkesszük meg mind a standard oldat, mind a kivonat regressziós vonalát, például az alábbiak szerint:

Határozzuk meg a standard legalacsonyabb szint (SA) regressziós pontját a következő képlet segítségével:

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

Határozzuk meg a standard legmagasabb szint (SM) regressziós pontját a következő képlet segítségével:

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

Hasonló módon számítsuk ki a regressziós pontokat a kivonat legalacsonyabb szintjére (UA) és a kivonat legmagasabb szintjére (UM) a fenti képletekben az s_1, s_2, s_4 és s_8 helyeire u_1, u_2, u_4 és u_8 behelyettesítésével ([1]).

Jegyezzük fel a kiszámított SA és SM értékeket ugyanarra a milliméterpapírra és kössük össze őket, hogy kiadják a standard oldat regressziós vonalát. Hasonló módon jegyezzük fel az UA és UM értékeket és kössük össze őket, hogy kiadják a kivonat regressziós vonalát.

Ha nem lép fel interferencia, a vonalaknak párhuzamosaknak kell lenniük. Gyakorlati megfontolásból a vonalakat párhuzamosnak tekinthetjük, ha az (SM – SA) és (UM – UA) középértékeitől való eltérése nem haladja meg a 10 %-ot.

Ha a vonalak nem tekinthetőek párhuzamosnak, akkor vagy az u_1 és s_1, vagy az u_8 és s_8 elhanyagolható, az SA, SM, UA és UM értékek pedig alternatív képletekkel számolhatók ki, hogy megkapjuk az alternatív regressziós vonalakat:

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

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

és hasonló módon az UA-ra és UM-ra vonatkozóan. Ugyanaz a párhuzamossági feltétel érvényes ebben az esetben is. Azt a tényt, hogy az eredmény kiszámítása három tényező alapján történt, fel kell tüntetni a zárójelentésen.

([1]) Az „s” és „u” kisbetűk a gátlási zónák átmérőit jelölik.

Ha a vonalak párhuzamosnak tekinthetőek, akkor számoljuk ki a relatív aktivitás logaritmusát (log A) a következő képletek egyikének felhasználásával, attól függően, hogy három vagy négy tényező alapján történt a párhuzamosság megállapítása.

Négy tényező esetén

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

Három tényező esetén

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

vagy

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

A mintakivonat aktivitása = a megfelelő standard aktivitása × A

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

Ha a relatív aktivitás a 0,5 és 2,0 közötti tartományon kívül esik, akkor ismételjük meg a vizsgálatot a kivonat koncentrációin, vagy ahol ez nem lehetséges, ott a standard oldatokon végzett megfelelő módosításokkal. Ha a relatív aktivitást nem tudjuk az előírt tartományon belül tartani, akkor bármely kapott eredményt közelítő eredménynek kell tekinteni, és ezt fel kell tüntetni a zárójelentésen.

Ha a vonalak nem tekinthetőek párhuzamosnak, meg kell ismételni a meghatározást. Ha a párhuzamosságot még ezután sem sikerül elérni, akkor a meghatározást sem kielégítőnek kell tekinteni.

Az eredményt a takarmány kilogrammjában lévő spiramicin-bázis milligrammos értékében fejezzük ki.

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon mintán, ugyanazon analitikus által párhuzamosan végzett két meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– a 10 mg/kg alatti spiramicin-bázis tartalmak esetén a 2 mg/kg-ot, abszolút értékben,

– a 10 és 25 mg/kg közötti tartalmak esetén a legmagasabb érték 20 %-át,

– a 25 és 50 mg/kg közötti tartalmak esetén a 5 mg/kg-ot, abszolút értékben,

– az 50 mg/kg feletti tartalmak esetén a legmagasabb érték 10 %-át.