31984L0425

L 238/34 *EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS* 1984 9 6

DEŠIMTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA, 1984 m. liepos 25 d. nustatanti analizės metodus oficialiai pašarų kontrolei Bendrijoje

(84/425/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų valstybinei pašarų kontrolei, įvedimo [1] su paskutiniais pakeitimais, padarytais Graikijos stojimo sutartyje, ir būtent į tos sutarties 2 straipsnį,

kadangi minėtoje direktyvoje reikalaujama, kad tikrinant, ar pašarai atitinka įstatymų bei kitų teisės aktų nuostatų jiems keliamus reikalavimus dėl kokybės ir sudėties, oficiali pašarų kontrolė būtų vykdoma, naudojant Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodus;

kadangi, Komisijos direktyvos 71/250/EEB [2], 73/46/EEB [3], 74/203/EEB [4], 75/84/EEB [5], 76/372/EEB [6] su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyvoje 81/680/EEB [7]; Direktyvose 71/393/EEB [8], 72/199/EEB [9], 78/633/EEB [10] su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyvoje 84/4/EEB [11]; bei Direktyvoje 81/715/EEB [12] jau numatė kai kuriuos Bendrijos analizės metodus; kadangi, atsižvelgiant į nuo to laiko padarytą pažangą reikėtų patvirtinti naują metodą;

kadangi šioje direktyvoje numatytos priemonės sutampa su Nuolatinio pašarų komiteto nuomone,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės reikalauja, kad analizė, vykdant valstybinę pašarų kontrolę spiramicino kiekiui nustatyti, būtų atliekama pagal priede aprašytą metodą.

2 straipsnis

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 1985 m. birželio 30 d., įgyvendina šią direktyvą, ir apie tai nedelsiant informuoja Komisiją.

3 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1984 m. liepos 25 d.

Komisijos vardu

Poul DALSAGER

Komisijos narys

---

(1) OL L 170, 1970 8 3, p. 2.
(2) OL L 155, 1971 7 12, p. 13.
(3) OL L 83, 1973 3 30, p. 21.
(4) OL L 108, 1974 4 22, p. 7.
(5) OL L 32, 1975 2 5, p. 26.
(6) OL L 102, 1976 4 15, p. 8.
(7) OL L 246, 1981 8 29, p. 32.
(8) OL L 279, 1971 12 20, p. 7.
(9) OL L 123, 1972 5 29, p. 6.
(10) OL L 206, 1978 7 29, p. 43.
(11) OL L 15, 1984 1 18, p. 28.
(12) OL L 257, 1981 9 10, p. 38.

PRIEDAS

SPIRAMICINO NUSTATYMAS MATUOJANT DIFUZIJĄ AGARE

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šis metodas naudojamas spiramicinui nustatyti pašaruose ir jų prieduose. Nustatymo riba yra 1 mg/kg (1ppm) ([1])

2. Metodo esmė

Mėginys ekstrahuojamas su metanolio ir fosfatinio-karbonatinio buferio mišiniu, kai pH yra 8. Ekstraktas nupilamas arba centrifuguojamas ir atskiedžiamas. Jo antibiotinis aktyvumas nustatomas, išmatuojant spiramicino difuziją agarinėje terpėje, kurioje pasėtas *Micrococcus luteus*. Difuziją parodo mikroorganizmo inhibicijos zonų formavimasis. Šių zonų skersmuo laikomas tiesiogiai proporcingu antibiotiko koncentracijos logaritmui naudotų antibiotiko koncentracijų skalėje.

3. Mikroorganizmas: *Micrococcus luteus* ATTC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. *Pradinės bakterijų kultūros laikymas*

Į mėgintuvėlius su gulsčiąja mitybine terpe (4.1) pasėjama *Micrococcus luteus* ir inkubuojama 24 val. 30 °C temperatūroje. Bakterijos laikomos šaldytuve 4 °C temperatūroje. Persėjama kas dvi savaites.

3.2. *Bakterijų suspensijos paruošimas* ([2])

Viskas, kas užaugo, surenkama nuo neseniai paruošto gulsčiojo agaro (3.1), panaudojant 2–3 ml natrio chlorido tirpalo (4.3). Ši suspensija pasėjama į 250 ml bakterijų auginimo terpę (4.1), kuri yra *Roux* kolboje, ir inkubuojama 18–20 val. 30 °C temperatūroje. Bakterijos surenkamos į 25 ml natrio chlorido tirpalą (4.3) ir išmaišomos. Suspensija atskiedžiama natrio chlorido tirpalu (4.3), santykiu 1:10. Suspensijos šviesos pralaidumo koeficientas, matuojant 650 nm srityje 1 cm storio kiuvetėje ir lyginant su natrio chlorido tirpalu (4.3), turi būti apie 75 %. Šią suspensiją galima laikyti savaitę maždaug 4 °C temperatūroje.

4. Mitybinės terpės ir reagentai

4.1. *Mitybinė terpė* ([3])

Mėsos peptonas	6,0 g
Tripsino peptonas	4,0 g
Mielių ekstraktas	3,0 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Gliukozė	1,0 g
Agaras	nuo 10,0 iki 20,0 g
Vanduo	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (po sterilizavimo)	

4.2. *Nustatymo terpė* ([3])

Tripsino peptonas	5,0 g
Mielių ekstraktas	4,0 g
Mėsos ekstraktas	3,0 g
Agaras	nuo 10,0 iki 20,0 g
Vanduo	1 000 ml
pH 8,0 (po sterilizavimo)	

([1]) 1 mg spiramicino bazės atitinka 3 200 tarptautinių vienetų (IU).

([2]) Galima naudoti kitus metodus, jei nustatyta, kad juos naudojant gaunamos panašios bakterijų suspensijos.

([3]) Galima naudoti bet kokią panašios sudėties komercinę bakterijų auginimo terpę, kuri duoda panašius rezultatus.

4.3. *Natrio chlorido tirpalas 0,8 % (m/v)*

8 g natrio chlorido ištirpdoma vandenyje ir atskiedžiama iki 1 000 ml; sterilizuojama.

4.4. *Fosfatinis-karbonatinis buferis, pH 8,0*

Dikalio-vandenilio fosfatas K_2HPO_4	16,7 g
Kalio-divandenilio fosfatas KH_2PO_4	0,5 g
Natrio-vandenilio karbonatas $NaHCO_3$	20,0 g
Vanduo iki	1 000 ml

4.5. *Metanolio ir fosfatinio-karbonatinio buferinio tirpalo (4.4) mišinys*

50/50 (v/v).

4.6. *Standartinė medžiaga*

Žinomo aktyvumo spiramicinas (T. V.).

5. **Standartiniai tirpalai**

Ištirpinama tiksliai pasvertas standartinės medžiagos kiekis (4.6) mišinyje (4.5) ir skiedžiama tuo pačiu mišiniu, kol gaunamas pradinis standartinis tirpalas, kurio 1 ml yra 1 000 IU spiramicino. Laikomas užkimštoje kolboje, 4 °C temperatūroje, šis tirpalas išlieka stabilus penkias paras.

Iš šio pradinio tirpalo, skiedžiant mišiniu (4.5), paruošiami tokie tirpalai:

S_8	1	T. V./ml
S_4	0,5	T. V./ml
S_2	0,25	T. V./ml
S_1	0,125	T. V./ml

6. **Ekstrakto ir tiriamų tirpalų paruošimas**

6.1. *Ekstrahavimas*

Pasveriama 20,0 g pašarų arba 1–20 g premiksų. Pripilama 100 ml mišinio (4.5) ir 30 minučių purtoma. Centrifuguojama arba nupilama ir centrifugatas atskiedžiamas mišiniu (4.5), kad gautųsi numatomas 1 T. V./ml (= U_8) spiramicino koncentracijos tirpalas.

Numatomiems spiramicino kiekiams, mažesniems negu 2,5 mg/kg, pašarų ekstraktas ruošiamas taip: pasveriama 20,0 g mėginio. Pripilama 100 ml mišinio (4.5) ir 30 min. purtoma. Keletą minučių centrifuguojama, paimama 50 ml centrifugato ir išgarinamae iki maždaug 4 ml sumažintame slėgyje sukamajame garintuve, temperatūrai neviršijant 40 °C. Likutis, atskiedžiamas mišiniu (4.5), kad gautųsi numatomos 1 T. V./ml (= U_8) koncentracijos spiramicino tirpalas.

6.2. *Tiriami tirpalai*

Iš U_8 tirpalo nuosekliai skiedžiant per pusę (1 + 1) mišiniu (4.5) paruošiami tirpalai U_4 (numatoma koncentracija 0,5 T. V./ml), U_2 (numatoma koncentracija: 0,25 T. V./ml) ir U_1 (numatoma koncentracija: 0,125 T. V./ml).

7. **Darbo procedūra**

7.1. *Sėjimas į nustatymo mitybinę terpę*

Nustatymo terpėje (4.2) pasėjama bakterinė suspensija (3.2), esant 50 °C temperatūrai. Išankstiniais bandymais ant lėkštelių su bandomąja terpe (4.2) nustatoma, koks bakterinės suspensijos kiekis reikalingas, kad būtų gautos didžiausios ir aiškiausios inhibicijos zonos įvairios koncentracijos spiramicinui.

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija agare atliekama lėkštutėse su keturių skirtingų koncentracijų standartiniais tirpalais (S_8, S_4, S_2, S_1) ir keturių skirtingų koncentracijų bandomaisiais tirpalais (U_8, U_4, U_2, U_1). Visi šie skirtingos koncentracijos standartiniai tirpalai ir ekstraktai turi būti būtinai įpilti į kiekvieną lėkštelę. Todėl naudojamos pakankamai didelės lėkštelės, kad agaro terpėje būtų galima padaryti bent aštuonias nuo 10 iki 13 mm skersmens skylutes, tarp kurių centrų atstumas būtų ne mažesnis negu 30 mm. Šį bandymą galima atlikti lėkštelėse, padarytose iš stiklo plokštelių, iš viršaus padengtų 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio ar plastiko žiedais.

Į lėkšteles įpilamas toks kiekis pagal 7.1 apsėtos terpės (4.2), kad susidarytų maždaug 2 mm storio sluoksnis (200 mm skersmens lėkštelei – 60 ml). Leidžiama sutirštėti horizontalioje padėtyje, padaromos skylutės ir į jas įlašinami tiksliai pamatuoti bandomojo ir standartinio tirpalo kiekiai (tarp 0,10 ir 0,15 ml į vieną skylutę, atsižvelgiant į jos skersmenį). Kiekvienos koncentracijos tirpalas naudojamas bent keturis kartus, kad kiekvienąkart nustatant būtų įvertinama 32 inhibicijos zonos.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštutės inkubuojamos nuo 16 iki 18 val., esant 30 ± 2 °C temperatūrai.

8. **Įvertinimas**

Išmatuojamas inhibicijos zonų skersmuo 0,1 mm tikslumu. Pažymimas kiekvienos koncentracijos išmatavimų matematinis vidurkis ant pusiau logaritminio grafinio popieriaus, parodant koncentracijų logaritmo priklausomybę nuo inhibicijos zonų skersmens. Nubrėžiamos „tinkamiausios“ linijos tiek standartiniam tirpalui, tiek ekstraktui pagal žemiau pateiktą pavyzdį.

Nustatomas „tinkamiausias“ taškas mažiausiai standartinio tirpalo koncentracijai (SL) pagal formulę:

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

Nustatomas „tinkamiausias“ taškas didžiausiai standartinio tirpalo koncentracijai (SH) pagal formulę:

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

Panašiai apskaičiuojami „tinkamiausi“ taškai mažiausiai UL ir didžiausiai UH koncentracijai ekstrakte, pakeičiant u_1, u_2, u_4 ir u_8 į s_1, s_2, s_4 ir s_8 aukščiau pateiktose formulėse (1).

Tame pačiame grafiniame grafike pažymimos SL ir SH vertės ir jos sujungiamos taip, kad gautųsi „tinkamiausia“ linija standartiniam tirpalui. Panašiai pažymimos UL ir UH ir jos sujungiamos, kad gautųsi „tinkamiausia“ linija ekstraktui.

Jei nėra jokių trukdžių, abi linijos turi būti lygiagrečios. Praktiniais sumetimais linijas galima laikyti lygiagrečiomis, jeigu vertės (SH – SL) ir (UH – UL) nesiskiria nuo savo vidutinių verčių daugiau kaip 10 %.

Jeigu linijos nėra lygiagrečios, galima išmesti arba u_1 ir s_1, arba u_8 ir s_8, o SL, SH, UL ir UH apskaičiuoti pagal alternatyvią formulę, kad gautųsi alternatyvios „tinkamiausios“ linijos:

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

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

Panašiai apskaičiuojamos ir UL bei UH. Turi būti remiamasi tuo pačiu lygiagretumo kriterijumi. Tai, kad galutinis rezultatas buvo apskaičiuotas iš trijų verčių, turi būti nurodoma galutinėje ataskaitoje.

(1) Mažosios s ir u raidės reiškia inhibicijos zonų skersmenį.

Kai laikoma, kad linijos lygiagrečios, apskaičiuojamas santykinio aktyvumo logaritmas (log A) pagal vieną iš toliau pateikiamų formulių, atsižvelgiant į tai, ar lygiagretumas buvo vertinamas iš trijų, ar iš keturių lygių.

Keturiems lygiams

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

Trims lygiams

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

arba

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

Mėginio ekstrakto aktyvumas = atitinkamo standarto aktyvumas × A

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

Jeigu apskaičiuojama, kad santykinis aktyvumas nėra tarp 0,5 ir 2,0, bandymas pakartojamas atitinkamai keičiant ekstrakto koncentraciją arba, jeigu tai neįmanoma, standartinių tirpalų koncentraciją. Kai santykinis aktyvumas yra už nustatytos skalės ribų, bet koks gautas rezultatas turi būti laikomas apytiksliu, ir tai turi būti nurodyta galutinėje ataskaitoje.

Kai linijos negali būti laikomos lygiagrečiomis, pakartojama nustatymo eiga. Jeigu vis tiek nėra lygiagretumo, nustatymas turi būti laikomas nepatenkinamu.

Rezultatą išreikškite spiramicino bazės miligramais vienam kilogramui pašarų.

9. **Pakartojamumas**

Dviejų to paties tyrėjo iš to paties mėginio atliktų nustatymų rezultatai neturi skirtis daugiau nei:

— 2 mg/kg spiramicino bazės kiekiui iki 10 mg/kg pagal absoliučią vertę,

— 20 % nuo didžiausios vertės, kai spiramicino bazės yra nuo 10 iki 25 mg/kg,

— 5 mg/kg spiramicino bazės kiekiui nuo 25 iki 50 mg/kg pagal absoliučią vertę,

— 10 % nuo didžiausios vertės, kai spiramicino bazės yra daugiau kaip 50 mg/kg.