31984L0425

KOMISIJAS DESMITĀ DIREKTĪVA (1984. gada 25. jūlijs), ar ko nosaka Kopienas analīzes metodes barības oficiālajai kontrolei

(84/425/EEK)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu 70/373/EEK par paraugu ņemšanas un analīzes Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei [1], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Grieķijas Pievienošanās aktu, un jo īpaši tās 2. pantu,

tā kā minētajā direktīvā ir prasīts veikt oficiālu barības kontroli, izmantojot paraugu ņemšanas un analīzes Kopienas metodes, lai pārbaudītu atbilstību prasībām, kas normatīvo un administratīvo aktu noteikumos paredzētas attiecībā uz barības kvalitāti un sastāvu;

tā kā ar Komisijas Direktīvām 71/250/EEK [2], 73/46/EEK [3], 74/203/EEK [4], 75/84/EEK [5], 76/372/EEK [6], kurās jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 81/680/EEK [7], Direktīvām 71/393/EEK [8], 72/199/EEK [9], 78/633/EEK [10], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 84/4/EEK [11], un Direktīvu 81/715/EEK [12] jau ir noteiktas vairākas Kopienas analīzes metodes; tā kā sakarā ar panākumiem darbā, kas gūti kopš tā laika, ieteicams pieņemt jaunu metodi;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas sniegto atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis prasa, lai analīzes barības oficiālai kontrolei, ciktāl tā attiecas uz spirimicīna saturu, izdara saskaņā ar pielikumā aprakstīto metodi.

2. pants

Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvi un administratīvi akti, kas vajadzīgi, lai vēlākais līdz 1985. gada 30. jūnijam panāktu atbilstību šai direktīvai, un par to dalībvalstis tūlīt informē Kopienu.

3. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1984. gada 25. jūlijā

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Poul DALSAGER

---

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

PIELIKUMS

SPIRIMICĪNA NOTEIKŠANA PĒC DIFŪZIJAS AGARA BAROTNĒ

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Metode paredzēta spirimicīna noteikšanai barībā un premiksos. Zemākā noteikšanas robeža ir 1 mg/kg (1 ppm) ([1]).

2. **Princips.**

Paraugu ekstraģē ar metilspirta/fosfāta-bikarbonāta buferšķīduma maisījumu, kura pH ir 8. Ekstraktu dekantē vai centrifugē un atšķaida. Tā antibiotisko aktivitāti nosaka, mērot spirimicīna difūziju ar *Micrococcus luteus* apsētā agara barotnē. Difūziju parāda mikroorganisma kavējuma zonu veidošanās. Minēto zonu diametru pieņem par tieši proporcionālu antibiotikas koncentrācijas logaritmam izmantotajā antibiotikas koncentrācijas intervālā.

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

3.1. Izejas kultūras uzturēšana.

Uzsējumu mēģenēs barotnē (4.1.) uzsēj slīpus *Micrococcus luteus* uzsējumus un 24 stundas inkubē 30 °C temperatūrā. Kultūru glabā ledusskapī apmēram 4 °C temperatūrā. Atkārtotu uzsēšanu veic reizi divās nedēļās.

3.2. Baktēriju suspensijas gatavošana ([a]).

No nesen sagatavota slīpagara (3.1.) ar 2 līdz 3 ml nātrija hlorīda šķīduma (4.3.) novāc pieaugumu. Šo suspensiju lieto 250 ml barotnes (4.1.) uzsējumam Rū kolbā un inkubē 18 līdz 20 stundas 30 °C temperatūrā. Pieaugumu novāc ar 25 ml nātrija hlorīda šķīduma (4.3.) un samaisa. Suspensiju atšķaida ar nātrija hlorīda šķīdumu (4.3.) attiecībā 1/10. Suspensijas gaismas caurlaidībai jābūt apmēram 75 %, mērot 650 nm 1 cm kivetē pret nātrija hlorīda šķīdumu (4.3.). Šo suspensiju var glabāt vienu nedēļu apmēram 4 °C temperatūrā.

4. **Barotnes un reaģenti.**

4.1. *Barotne* ([b]).

Gaļas peptons	6,0 g
Triptons	4,0 g
Rauga ekstrakts	3,0 g
Gaļas ekstrakts	1,5 g
Glikoze	1,0 g
Agars	no 10,0 līdz 20,0 g
Ūdens	1 000 ml

pH no 6,5 līdz 6,6 (pēc sterilizācijas).

4.2. *Izmēģinājuma vide* ([b]).

Triptons	5,0 g
Rauga ekstrakts	4,0 g
Gaļas ekstrakts	3,0 g
Agars	no 10,0 līdz 20,0 g
Ūdens	1 000 ml

pH 8,0 (pēc sterilizācijas).

([1]) 1 mg spirimicīna bāzes ir līdzvērtīgs 3 200 starptautiskajām vienībām (SV).

([a]) Var lietot citas metodes, ja ir noskaidrots, ka ar tām iegūst līdzīgas baktēriju suspensijas.

([b]) Var lietot jebkuru citu sērijveida barotni ar līdzīgu sastāvu, kura dod tādus pašus rezultātus.

4.3. *Nātrija hlorīda šķīdums 0,8 % (m/V).*

8 g nātrija hlorīda izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 000 ml; sterilizē.

4.4. *Fosfāta-bikarbonāta buferšķīdums ar pH 8,0.*

Dikālija hidrogēnfosfāts K_2HPO_4	16,7 g
Kālija dihidrogēnfosfāts KH_2PO_4	0,5 g
Nātrija hidrogēnkarbonāts $NaHCO_3$	20,0 g
Ūdens	līdz 1 000 ml

4.5. *Metilspirta/fosfāta-bikarbonāta buferšķīduma maisījums (4.4.).*

50/50 (V/V).

4.6. *Standartviela.*

Spirimicīns ar zināmu aktivitāti (SV).

5. **Standartšķīdumi.**

Precīzi nosvērtu standartvielas (4.6.) daudzumu izšķīdina maisījumā (4.5.) un atšķaida ar to pašu maisījumu, lai iegūtu rezerves šķīdumu, kura spirimicīna saturs ir 1 000 SV mililitrā. Šo šķīdumu noslēgtā kolbā 4 °C temperatūrā var glabāt ne ilgāk par piecām dienām.

No šā rezerves šķīduma, pakāpeniski atšķaidot ar maisījumu (4.5.), gatavo šādus šķīdumus:

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

6. **Ekstrakta un izmēģinājuma šķīduma gatavošana.**

6.1. *Ekstrakcija.*

Barības analīzes paraugam nosver 20,0 g barības, bet premiksu analīzes paraugam — no 1,0 līdz 20,0 g premiksu. Pievieno 100 ml maisījuma (4.5.) un krata 30 minūtes. Centrifugē vai dekantē un atšķaida centrifugātu ar maisījumu (4.5.), lai iegūtu paredzamo spirimicīna saturu 1 SV/ml (= U_8).

Ja paredzamais spirimicīna saturs barībā ir mazāks par 2,5 mg/kg, ekstrakcija jāveic šādi. Paraugam nosver 20,0 g barības. Pievieno 100 ml maisījuma (4.5.) un krata 30 minūtes. Centrifugē dažas minūtes, ņem 50 ml centrifugāta un apmēram 4 ml pie samazināta spiediena, temperatūrā, kas nepārsniedz 40 °C, ietvaicē rotācijas ietvaicētājā. Atšķaida atlikumu ar maisījumu (4.5.), lai iegūtu paredzamo spirimicīna saturu 1 SV/ml (= U_8).

6.2. *Izmēģinājuma šķīdumi.*

No šķīduma U_8, pakāpeniski atšķaidot (1 + 1) ar maisījumu (4.5.),gatavo šķīdumu U_4 (paredzamais saturs — 0,5 SV/ml), U_2 (paredzamais saturs — 0,25 SV/ml) un U_1 (paredzamais saturs — 0,125 SV/ml).

7. **Izmēģinājuma norise.**

7.1. *Izmēģinājuma vides uzsējums.*

Izmēģinājuma vidi (4.2.) apsēj ar baktēriju suspensiju (3.2.) apmēram 50 °C temperatūrā. Priekšmēģinājumos uz platēm ar izmēģinājuma vidi (4.2.) nosaka baktēriju suspensijas daudzumu, kāds vajadzīgs, lai ar dažādu koncentrāciju spirimicīnu iegūtu lielākās un skaidrākās kavējuma zonas.

7.2. *Plašu gatavošana.*

Difūziju agarā veic uz platēm, lietojot četru koncentrāciju standartšķīdumus (S_8, S_4, S_2, S_1) un četru koncentrāciju izmēģinājuma šķīdumus (U_8, U_4, U_2, U_1). Uz katras plates obligāti jābūt minēto četru koncentrāciju ekstraktam un standartšķīdumam. Šim nolūkam izvēlas plates, kas ir pietiekami lielas, lai agara barotnē var izveidot vismaz astoņas iedobes ar diametru no 10 līdz 13 mm, atstājot ne mazāk kā 30 mm starp to centriem. Testu var veikt uz platēm, kas sastāv no stikla loksnes un 200 mm diametra un 20 mm augsta anodēta alumīnija vai plastikas riņķa uz tās.

Uz platēm lej tādu daudzumu barotnes (4.2.), ko apsēj, kā noteikts 7.1., lai izveidojas apmēram 2 mm biezs slānis (60 ml uz 200 mm diametra plates). Ļauj tam nostāties līmeniski, izurbj iedobes, un tajās iepilda precīzi nomērītus izmēģinājuma šķīduma un standartšķīduma daudzumus (no 0,10 līdz 0,15 ml katrā iedobē — atbilstoši diametram). Katru koncentrāciju izmanto vismaz četras reizes, lai katrā noteikšanā novērtētu 32 kavējuma zonas.

7.3. *Inkubācija.*

Plates inkubē 16 līdz 18 stundas 30 ± 2 °C temperatūrā.

8. **Novērtējums.**

Ar 0,1 mm precizitāti izmēra kavējuma zonu diametru. Katrai koncentrācijai atbilstīgos vidējos mērījumus pieraksta uz puslogaritmiskā papīra, parādot koncentrāciju logaritmu attiecībā pret kavējuma zonu diametriem. Novelk standartšķīduma un ekstrakta taisnes, piemēram, kā parādīts tālāk tekstā.

"Atbilstošāko" punktu standarta zemākajam līmenim (SL) nosaka pēc formulas:

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

"Atbilstošāko" punktu standarta augstākajam līmenim (SH) nosaka pēc formulas:

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

Līdzīgi aprēķina "atbilstošākos" punktus ekstrakta zemākajam līmenim (UL) un ekstrakta augstākajam līmenim (UH), iepriekšminētajās formulās [1] attiecīgi s_1, s_2, s_4 un s_8 aizstājot ar u_1, u_2, u_4 un u_8.

Aprēķinātās SL un SH vērtības atzīmē uz tā paša puslogaritmiskā papīra un savieno, lai iegūtu standartšķīduma "atbiltošāko" līniju. Līdzīgi atzīmē un savieno UL un UH, lai iegūtu ekstrakta "atbilstošāko" līniju.

Ja nav nobīdes, līnijām vajadzētu būt paralēlām. Praktiskām vajadzībām līnijas var uzskatīt par paralēlām, ja lielumu (SH — SL) un (UH — UL) starpība nepārsniedz 10 % no to vidējā lieluma.

Ja līnijas nav uzskatāmas par paralēlām, u_1 un s_1 vai u_8 un s_8 var atmest, un, lai iegūtu alternatīvas "atbilstošākās" līnijas, SL, SH, UL un UH aprēķināt pēc alternatīvām formulām:

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

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

un līdzīgi aprēķināt UL un UH. Jāievēro tie paši paralelitātes kritēriji. Nobeiguma ziņojumā būtu jānorāda, ka rezultāts ir aprēķināts no trim līmeņiem.

[1] Mazie burti "s" un "u" attiecas uz kavējuma zonu diametriem.

Ja līnijas uzskata par paralēlām, aprēķina relatīvās aktivitātes logaritmu (log A) pēc vienas no šādām formulām atkarībā no tā, vai paralelitātes novērtējumā ir izmantoti trīs vai četri līmeņi.

Četru līmeņu gadījumā:

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

Triju līmeņu gadījumā:

d) $$\text{Log } A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - d_1}$$

vai

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

Parauga ekstrakta aktivitāte = attiecīgā standarta aktivitāte x A

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

Ja relatīvā aktivitāte ir ārpus intervāla no 0,5 līdz 2,0, eksperimentu atkārto, veicot īpašas ekstrakta koncentrāciju korekcijas vai, ja tas nav iespējams, standartšķīdumu koncentrāciju korekcijas. Ja relatīvā aktivitāte neiekļaujas attiecīgajā intervālā, jebkurš iegūtais rezultāts jāuzskata par aptuvenu, un tas jānorāda nobeiguma ziņojumā.

Ja līnijas nav uzskatāmas par paralēlām, noteikšanu atkārto. Ja tomēr nepanāk paralelitāti, noteikšana jāuzskata par neapmierinošu.

Rezultātu izsaka spirimicīna bāzes miligramos uz barības kilogramu.

9. **Atkārtojamība.**

Starpībai starp divu tādu paralēlu noteikšanu rezultātiem, ko veicis viens un tas pats laborants, lietojot vienu un to pašu paraugu, nevajadzētu pārsniegt:

— 2 mg/kg pēc absolūtā lieluma, ja spirimicīna bāzes saturs ir līdz 10 mg/kg,

— 20 % no augstākā lieluma, ja saturs ir no 10 līdz 25 mg/kg,

— 5 mg/kg pēc absolūtā lieluma, ja saturs ir no 25 līdz 50 mg/kg,

— 10 % no augstākā lieluma, ja saturs ir virs 50 mg/kg.