31984L0425

L 238/34 *ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV* 6.9.1984

DESIATA SMERNICA KOMISIE z 25. júla 1984, ktorá stanovuje metódy analýzy pri úradnej kontrole krmív v spoločenstve

(84/425/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód odoberania vzoriek a analýzy pri úradnej kontrole krmív v spoločenstve [1], naposledy zmenenú Aktom o pristúpení Grécka, a najmä na jej článok 2,

keďže táto smernica vyžaduje, aby sa úradná kontrola krmív na účely kontroly plnenia požiadaviek stanovených zákonom, iným právnym predpisom alebo správnym opatrením v súvislosti s kvalitou a zložením krmív vykonávala s použitím metód spoločenstva na odoberanie vzoriek a analýzy;

keďže smernice Komisie 71/250/EHS [2], 73/46/EHS [3], 74/203/EHS [4], 75/84/EHS [5], 76/372/EHS [6], naposledy zmenené a doplnené smernicou 81/680/EHS [7], smernice 71/393/EHS [8], 72/199/EHS [9], 78/633/EHS [10], naposledy zmenené a doplnené smernicou 84/4/EHS [11], a smernicou 81/715/EHS [12], už stanovili niekoľko metód spoločenstva na analýzu; keďže pokrok v práci si odvtedy žiada prijatie novej metódy;

keďže opatrenia stanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty musia žiadať, aby sa analýzy pre úradné kontroly krmív v súvislosti s ich obsahom spiramycínu vykonávali v súlade s metódami opísanými v prílohe.

Článok 2

Členské štáty musia uviesť do platnosti zákony, nariadenia alebo správne ustanovenia potrebné na plnenie tejto smernice najneskôr 30. júna 1985 a musia o tom informovať Komisiu.

Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 25. júla 1984

Za Komisiu

Poul DALSAGER

člen Komisie

---

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

PRÍLOHA

STANOVENIE SPIRAMYCÍNU DIFÚZIOU V AGAROVOM MÉDIU

1. **Účel a oblasť**

Metóda slúži na stanovenie obsahu spiramycínu v krmive a v premixoch. Dolná medza stanoviteľnosti je 1 mg/kg (1 ppm) [1]

2. **Princíp**

Vzorka sa extrahuje zmesou metylalkohol/fosfátbikarbonátovým pufrom s pH 8. Extrakt sa dekantuje alebo odstredí a zriedi. Jeho antibiotická aktivita sa stanoví meraním difúzie spiramycínu v agarovom médiu naočkovanom s *Micrococcus luteus*. Difúzia sa prejavuje tvorbou inhibičných zón mikroorganizmu. Vzťah medzi priemerom týchto zón a logaritmom koncentrácie antibiotika v rozsahu použitých antibiotických koncentrácií sa považuje za priamo úmerný.

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

3.1. Udržiavanie základnej kultúry

Naočkujte šikmé plochy kultivačného média (4.1) v skúmavkách mikroorganizmom *Micrococcus luteus* a inkubujte 24 hodín pri 30°C. Skladujte kultúru v chladničke pri teplote asi 4°C. Preočkujte každé dva týždne.

3.2. Príprava bakteriálnej suspenzie [a]

Zozbierajte produkt z čerstvo pripravenej šikmej plochy agaru (3.1) s 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Použite túto suspenziu na naočkovanie 250 ml kultivačného média (4.1) v Rouxovej banke a inkubujte 18 až 20 hodín pri 30 °C. Zozberajte produkt do 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a zhomogenizujte. Zrieďte suspenziu v pomere 1: 10 roztokom chloridu sodného (4.3). Priepustnosť svetla suspenzie meraná pri 650 nm v 1 cm kyvete oproti roztoku chloridu sodného (4.3) musí byť okolo 75 %. Túto suspenziu možno skladovať týždeň pri teplote asi 4 °C.

4. **Kultivačné médiá a činidlá**

4.1. *Kultivačné médium* [b]

Mäsový bujón	6,0 g
Tryptónový bujón	4,0 g
Kvasinkový extrakt	3,0 g
Mäsový extrakt	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 sterilizácii).

4.2. *Skúšobné médium* [b]

Tryptónový bujón	5,0 g
Kvasinkový extrakt	4,0 g
Mäsový extrakt	3,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml

pH 8,0 (po sterilizácii)

---

[1] 1 mg spyramicínovej bázy sa rovná 3 200 medzinárodným jednotkám (IU).

[a] Je možné použiť aj iné metódy, ak sa potvrdí, že dávajú podobné bakteriálne suspenzie.

[b] Môže sa použiť akékoľvek komerčné kultivačné médium s podobným zložením, ktoré prináša rovnaké výsledky.

4.3. *Chlorid sodný, NaCl roztok 0,8 % (w/v)*

Rozpustite 8 g chloridu sodného vo vode a zrieďte na 1 000 ml; sterilizujte.

4.4. *Fosfátbikarbonátový tlmivý roztok, pH = 8,0*

Hydrofosforečnan dvojdraselný K_2HPO_4	16,7 g
Dihydrofosforečnan draselný KH_2PO_4	0,5 g
Hydrouhličitan sodný $NaHCO_3$	20,0 g
Voda do	1 000 ml

4.5. *Zmes metylalkoholu a fosfátbikarbonátového tlmivého roztoku (4.4)*

50/50 (v/v).

4.6. *Štandardná látka*

Spiramycín so známou aktivitou (v IU).

5. **Štandardné roztoky**

Rozpustite presne odvážené množstvo štandardnej látky (4.6) v zmesi (4.5) a zrieďte tou istou zmesou tak, aby ste dostali základný roztok obsahujúci 1 000 IU spiramycínu v jednom mililitri. Roztok skladovaný v uzatvorenej banke pri 4 °C si udrží stabilitu päť dní.

Z tohto základného roztoku postupným riedením zmesou (4.5) pripravte nasledujúce 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. **Príprava extraktu a skúšobných roztokov**

6.1. *Extrakcia*

Odvážte vzorku s hmotnosťou 20,0 g v prípade krmiva a 1,0 až 20,0 g v prípade premixov. Pridajte 100 ml zmesi (4.5) a trepte 30 minút. Odstreďte alebo dekantujte a rozrieďte vyčírený roztok zmesou (4.5) tak, aby ste získali očakávaný obsah spiramycínu 1 IU/ml (= U_8).

Pre očakávané obsahy spiramycínu nižšie než 2,5 mg/kg krmiva sa musí vykonať extrakcia nasledujúcim spôsobom. Odvážte vzorku s hmotnosťou 20,0 g. Pridajte 100 ml zmesi (4.5) a trepte 30 minút. Niekolko minút odstreďujte, odoberte 50 ml vyčíreného roztoku a odparte na objem asi 4 ml za zníženého tlaku vo vákuovej rotačnej odparke pri teplote do 40 ° C. Rozrieďte zostatok zmesou (4.5), aby ste získali očakávaný obsah spiramycínu 1 IU/ml (= U_8).

6.2. *Skúšobné roztoky*

Postupným zrieďovaním (1 + 1) pomocou zmesi (4.5) z roztoku U_8 pripravte roztoky U_4 (očakávaný obsah: 0,5 IU/ml), U_2 (očakávaný obsah: 0,25 IU/ml) a U_1 (očakávaný obsah: 0,125 IU/ml).

7. **Postup skúšky**

7.1. *Očkovanie skúšobného média*

Naočkujte skúšobné médium (4.2) bakteriálnou suspenziou (3.2) pri teplote okolo 50 °C. Predbežným testovaním na platniach so skúšobným médiom (4.2) stanovte množstvo bakteriálnej suspenzie potrebnej na získanie najväčších a najjasnejších inhibičných zón s rôznymi koncentráciami spiramycínu.

7.2. *Príprava platní*

Difúzia v agare sa uskutoční na platniach so štyrmi koncentráciami štandardného roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a štyrmi koncentráciami skúšobného roztoku (U_8, U_4, U_2, U_1). Tieto štyri koncentrácie extraktu a štandardu sa musia umiestniť na každú platňu. Na to je potrebné vybrať dostatočne veľké platne, aby bolo možné urobiť do agaru aspoň osem jamiek s priemerom od 10 do 13 mm a aspoň s 30 mm odstupom medzi ich stredmi. Test sa môže urobiť na sklenených platniach s hliníkovým alebo plastickým prstencom s priemerom 200 mm a výškou 20 mm, pripevneným na nich.

Nalejte na platne médium (4.2) naočkované podľa 7.1 v takom množstve, aby ste získali asi 2 mm hrubú vrstvu (60 ml na platňu s priemerom 200 mm). Nechajte stuhnúť vo vodorovnej polohe, urobte jamky a umiestnite do nich presne odmerané objemy skúšobného a štandardného roztoku (podľa priemeru medzi 0,10 a 0,15 ml na každú jamku). Aplikujte každú koncentráciu aspoň štyrikrát, tak aby bolo každé stanovenie predmetom hodnotenia 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Inkubujte platne od 16 do 18 hodín pri teplote 30 ± 2 °C.

8. **Hodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón s presnosťou na 0,1 mm. Zaznamenajte priemerné merania každej koncentrácie na semilogaritmický grafický papier, tak aby sa ukázal logaritmus koncentrácií vo vzťahu k priemerom inhibičných zón. Vyneste optimálnu rastovú krivku štandardného roztoku a extraktu ako v príklade uvedenom nižšie.

Určite optimálny rastový bod pre najnižšiu koncentráciu štandardu (SL) podľa vzorca:

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

Stanovte optimálny rastový bod pre najvyššiu koncentráciu štandardu (SH) podľa vzorca:

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

Podobne vypočítajte optimálne rastové body pre najnižšiu koncentráciu extraktu (UL) a najvyššiu koncentráciu extraktu (UH) nahradením s_1, s_2, s_4 a s_8 za u_1, u_2, u_4 a u_8 vo vyššie uvedenom vzorci ([1]).

Zaznamenajte vypočítané hodnoty SL a SH na ten istý grafický papier a spojte ich, aby ste dostali „optimálnu rastovú“ krivku pre štandardný roztok. Podobne zaznamenajte UL a UH a spojte ich, aby ste dostali „optimálnu rastovú“ krivku pre extrakt.

Pri neprítomnosti interferencií majú byť krivky rovnobežné. Z praktických dôvodov sa krivky môžu považovať za rovnobežné, ak sa hodnoty (SH — SL) a (UH — UL) nelíšia viac ako o 10 % od ich priemernej hodnoty.

Ak nie sú krivky rovnobežné, môžeme vynechať buď u_1 a s_1, alebo u_8 a s_8 a vypočítať hodnoty SL, SH, UL a UH s použitím alternatívneho vzorca, ktorý vám dá alternatívne krivky „optimálneho rastu“:

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

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

a podobne aj UL a UH. Alternatívne krivky „optimálneho rastu“ majú spĺňať podobné kritériá rovnobežnosti. Skutočnosť, že výsledok sa vypočítal z troch koncentrácií, sa musí uviesť v záverečnej správe.

([1]) Malé písmená „s“ a „u“ označujú priemery inhibičných zón.

Keď sa krivky považujú za rovnobežné, vypočítajte logaritmus relatívnej aktivity (log A) pomocou jedného z nasledujúcich vzorcov v závislosti od toho, či sa pre stanovenie rovnobežnosti použijú tri, alebo štyri koncentrácie.

Pre štyri koncentrácie:

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

Pre tri koncentrácie:

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

alebo

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

Aktivita vzorky extraktu = aktivita relevantného štandardu × A

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

Ak je relatívna aktivita mimo rozpätia 0,5 až 2,0, opakujte skúšku a urobte vhodné úpravy koncentrácií extraktu alebo, ak to nie je možné, štandardných roztokov. Ak nie je možné dosiahnuť, aby mala relatívna aktivita požadované rozpätie, každý dosiahnutý výsledok sa musí považovať za približný a táto skutočnosť sa musí uviesť v záverečnej správe.

Ak sa krivky považujú za nerovnobežné, opakujte stanovenie. Ak ani potom nedosiahnete rovnobežnosť, musí sa stanovenie považovať za neuspokojivé.

Vyjadrite výsledok v miligramoch spiramycínovej bázy na kilogram krmiva.

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke tým istým laborantom/analytikom nesmie presiahnuť:

— 2 mg/kg v absolútnej hodnote pre obsah spiramycínovej bázy do 10 mg/kg,

— 20 % relatívnych z najvyššej hodnoty pre obsahy od 10 do 25 mg/kg,

— 5 mg/kg v absolútnej hodnote pre obsahy od 25 do 50 mg/kg,

— 10 % relatívnych z najvyššej hodnoty pre obsahy nad 50 mg/kg.