31984L0425

DESETA DIREKTIVA KOMISIJE
z dne 25. julija 1984
o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme

(84/425/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme (1), kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu Grčije, ter zlasti člena 2 Direktive,

ker navedena direktiva zahteva, da se uradni nadzor krme izvaja z uporabo metod vzorčenja in analiz Skupnosti zaradi preverjanja skladnosti z zahtevami, določenimi z zakoni in drugimi predpisi v zvezi s kakovostjo in sestavo krme;

ker so direktive Komisije 71/250/EGS (2), 73/46/EGS (3), 74/203/EGS (4), 75/84/EGS (5), 76/372/EGS (6), kakor so bile nazadnje spremenjene z Direktivo 81/680/EGS (7), direktive 71/393/EGS (8), 72/199/EGS (9), 78/633/EGS (10), kakor so bile nazadnje spremenjene z Direktivo 84/4/EGS (11), in Direktiva 81/715/EGS (12) že določile številne analitske metode Skupnosti; ker je zaradi napredka dela od takrat priporočljivo sprejeti novo metodo;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zahtevajo, da se analize vsebnosti spiramicina za uradni nadzor krme izvajajo skladno z metodo, opisano v Prilogi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 30. junija 1985 in o tem nemudoma obvestijo Komisijo.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 25. julija 1984

Za Komisijo

Poul DALSAGER

Član Komisije

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

PRILOGA

DOLOČANJE SPIRAMICINA Z DIFUZIJO NA AGARSKEM GOJIŠČU

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje vsebnosti spiramicina v krmi in premiksih. Meja določanja je 1 mg/kg (1 ppm) ([1]).

2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z mešanico metanol/fosfatbikarbonatnega pufra pri pH 8. Ekstrakt dekantiramo ali centrifugiramo in razredčimo. Njegovo antibiotično aktivnost določimo z merjenjem difuzije spiramicina na agarskem gojišču, nacepljenem z *Micrococcus luteus*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Premer teh con je premosorazmeren logaritmu koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

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

3.1 *Vzdrževanje osnovne kulture*

V epruvete s poševnim nanosom gojišča (4.1) nacepimo *Micrococcus luteus* in inkubiramo 24 ur pri 30 °C. Kulturo hranimo v hladilniku pri približno 4 °C. Vsakih štirinajst dni precepimo.

3.2 *Priprava suspenzij bakterije* ([a])

Prirastek pred kratkim pripravljenega agarskega poševnega nanosa (3.1) posnamemo z 2 do 3 ml raztopine natrijevega klorida (4.3). To suspenzijo uporabimo za nacepljenje 250 ml gojišča (4.1), vsebovanega v Rouxovi bučki, in inkubiramo 18 do 20 ur pri temperaturi 30 °C. Prirastek posnamemo s 25 ml raztopine natrijevega klorida (4.3) in premešamo. Z raztopino natrijevega klorida (4.3) razredčimo suspenzijo na 1/10. Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti 75-odstotna, izmerjena pri 650 nm v 1-cm kiveti proti raztopini natrijevega klorida (4.3). Suspenzijo lahko hranimo en teden pri temperaturi približno 4 °C.

4. Gojišča in reagenti

4.1 *Gojišče* ([b])

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml

pH 6,5 do 6,6 (po sterilizaciji).

4.2 *Preskusno gojišče* ([b])

Tripton	5,0 g
Kvasni ekstrakt	4,0 g
Mesni ekstrakt	3,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml

pH 8,0 (po sterilizaciji).

([1]) 1 mg baze spiramicina je enakovreden 3 200 mednarodnim enotam (IU).

([a]) Uporabimo lahko tudi druge metode, če je ugotovljeno, da dajejo podobne bakterijske suspenzije.

([b]) Uporabimo lahko vsakršno komercialno gojišče podobne sestave, ki daje enake rezultate.

4.3 *0,8-odstotna (m/v) raztopina natrijevega klorida*

V vodi raztopimo 8 g natrijevega klorida in ga razredčimo z vodo do 1 000 ml; nato steriliziramo.

4.4 *Fosfatnobikarbonatni pufer, pH 8,0*

Dikalijev hidrogenfosfat K_2HPO_4	16,7 g
Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4	0,5 g
Natrijev hidrogenkarbonat $NaHCO_3$	20,0 g
Voda do	1 000 ml

4.5 *Mešanica metanola in fosfatbikarbonatnega pufra (4.4)*

50/50 (v/v).

4.6 *Standardna substanca*

Spiramic znane aktivnosti (v IU).

5. **Standardne raztopine**

Točno natehtano količino standardne substance (4.6) raztopimo v mešanici (4.5) in razredčimo z isto mešanico, da dobimo osnovno raztopino, ki vsebuje 1 000 IU spiramicina na mililiter. Raztopina je stabilna do pet dni, če jo hranimo v zaprti bučki pri 4 °C.

Iz te osnovne raztopine z zaporednimi razredčenji z mešanico (4.5) pripravimo naslednje raztopine:

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

6. **Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin**

6.1 *Ekstrakcija*

Pri krmi natehtamo 20,0 g vzorca, pri premiksih pa 1,0 do 20,0 g. Dodamo 100 ml mešanice (4.5) in stresamo 30 minut. Centrifugiramo ali dekantiramo in bistro raztopino nad usedlino razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost spiramicina 1 IU/ml (= U_8).

Za pričakovane vsebnosti spiramicina, nižje od 2,5 mg/l krme, mora biti ekstrakcija izvedena na naslednji način. Natehtamo 20 g vzorca, dodamo 100 ml mešanice (4.5) in 30 minut stresamo. Nato nekaj minut centrifugiramo in 50 ml raztopine nad usedlino pri znižanem tlaku uparimo do približno 4 ml v rotacijskem uparjalniku pri temperaturi, ki ne presega 40 °C. Ostanek razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost spiramicina 1 IU/ml (= U_8).

6.2 *Preskusne raztopine*

Iz raztopine U_8 z zaporednim redčenjem (1 + 1) z mešanico (4.5) pripravimo raztopine U_4 (pričakovana vsebnost: 0,5 IU/ml), U_2 (pričakovana vsebnost: 0,25 IU/ml) in U_1 (pričakovana vsebnost: 0,125 IU/ml).

7. **Preskusni postopek**

7.1 *Nacepljenje preskusnega gojišča*

Preskusno gojišče (4.2) nacepimo s suspenzijo bakterij (3.2) pri približno 50 °C. S predhodnimi poskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.2) določimo količino bakterijske suspenzije, ki daje največje in najjasnejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami spiramicina.

7.2 *Priprava plošč*

Difuzijo skozi agar izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine (S_8 S_4, S_2, S_1) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine (U_8, U_4, U_2, U_1). Na vsako ploščo moramo nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standarda. V ta namen izberemo plošče, ki so dovolj velike za najmanj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm, z najmanj 30 mm razdalje med središči, ki jih izdolbemo v agarskem gojišču. Preskus lahko izvajamo na steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike, premera 200 mm in višine 20 mm.

Na plošče nanesemo določeno količino gojišča (4.2), nacepljenega skladno s točko 7.1, da dobimo približno 2 mm debelo plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakamo, da se površina utrdi. Nato izdolbemo vdolbine ter vlijemo vanje točno odmerjene volumne preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, odvisno od premera). Vsako koncentracijo nanesemo najmanj štirikrat, tako da pri vsakem preskusu ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

7.3 *Inkubacija*

Plošče inkubiramo 16 do 18 ur pri temperaturi 30 ± 2 °C.

8. **Vrednotenje**

Premer inhibicijskih con izmerimo s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo vnesemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premera inhibicijskih con. Na diagramu izrišemo premice z najboljšim potekom, in sicer za standardno raztopino, pa tudi za ekstrakt, kakor je navedeno spodaj.

Z naslednjo enačbo določimo „najboljšo“ točko za najnižjo vrednost standardne raztopine (SL):

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

Z naslednjo enačbo določimo „najboljšo“ točko za najvišjo vrednost standardne raztopine (SH):

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

Podobno izračunamo „najboljše“ točke za najnižjo (UL) in najvišjo vrednost ekstrakta (UH), tako da v zgornjih enačbah s_1, s_2, s_4 in s_8 nadomestimo z u_1, u_2, u_4, in u_8 [1].

Izračunani vrednosti SL in SH vnesemo v isti diagram in ju povežemo, da dobimo premico z najboljšim potekom za standardno raztopino. Podobno vnesemo vrednosti UL in UH ter ju povežemo, da dobimo premico z „najboljšim“ potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, bi morali biti premici vzporedni. Iz praktičnih razlogov lahko premici obravnavamo kot vzporedni, če se vrednosti (SH — SL) in (UH — UL) ne razlikujejo za več kakor 10 % od svojih srednjih vrednosti.

Če premici nista vzporedni, lahko izločimo bodisi u_1 in s_1 ali u_8 in s_8, z vrednostmi SL, SH, UL in UH pa z alternativnimi enačbami izračunamo alternativni premici z „najboljšim“ potekom:

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

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

in podobno za UL in UH. Tudi v tem primeru veljajo iste zahteve za vzporednost. Če rezultat izračunamo iz treh vrednosti, moramo to navesti v končnem poročilu.

[1] Mali črki „s“ in „u“ se nanašata na premera inhibicijskih con.

Kadar premici obravnavamo kot vzporedni, izračunamo logaritem relativne aktivnosti (log A), in sicer z eno od naslednjih enačb, odvisno od tega, ali smo za oceno vzporednosti uporabili tri ali štiri vrednosti.

Za štiri vrednosti

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

Za tri vrednosti

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

ali

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

Aktivnost ekstrakta vzorca = aktivnost ustreznega standarda × A

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

Če je relativna aktivnost zunaj območja od 0,5 do 2,0, ponovimo preskus tako, da ustrezno prilagodimo koncentracije ekstrakta, če je to mogoče, sicer prilagodimo standardne raztopine. Če relativne aktivnosti ni mogoče privesti v zahtevano območje, obravnavamo vse rezultate kot približke in moramo to navesti v končnem poročilu.

Če menimo, da premici nista vzporedni, postopek določanja ponovimo. Če vzporednost še vedno ni dosežena, moramo določitev obravnavati kot nezadovoljivo.

Rezultat izrazimo v miligramih spiramicinske baze na kilogram krme.

9. **Ponovljivost**

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

— 2 mg/kg v absolutni vrednosti, za vsebnosti spiramicinske baze do 10 mg/kg,

— 20 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,

— 5 mg/kg v absolutni vrednosti, za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,

— 10 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti nad 50 mg/kg.