31984L0425

6.9.1984 ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ L 238/34

ДЕСЕТА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА
от 25 юли 1984 година
относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(84/425/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейката икономическа общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни [1], последно изменена с Акта за присъединяване на Гърция, и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че посочената директива изисква официалният контрол на храните за животни с цел проверка на съответствието с изискванията, предвидени със законов, подзаконов или административен акт, по отношение на качеството им и състава да се извършва въз основа на общностни методи за вземане на проби и анализ;

като има предвид, че Директиви 71/250/ЕИО [2], 73/46/ЕИО [3], 74/203/ЕИО [4], 75/84/ЕИО [5], 76/372/ЕИО [6] на Комисията, последно изменени с Директива 81/680/ЕИО [7], и Директиви 71/393/ЕИО [8], 72/199/ЕИО [9], 78/633/ЕИО [10], последно изменени с Директива 84/4/ЕИО [11], и Директива 81/715/ЕИО [12], вече са предвидили редица общностни методи за анализ; като има предвид, че с оглед напредъка в работата е препоръчително да се приеме нов метод;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки изискват анализът за целите на официалния контрол на храните за животни по отношение съдържанието на спирамицин в тях да се извършва съгласно описания в приложението метод.

Член 2

Държавите-членки въвеждат в сила законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими за да се съобразят с настоящата директива, най-късно до 30 юни 1985 г. и незабавно уведомяват Комисията за това.

Член 3

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 25 юли 1984 година.

За Комисията

Poul DALSAGER

Член на Комисията

---

(1) ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.
(2) ОВ L 155, 12 7.1971 г., стр. 13.
(3) ОВ L 83, 30.3.1973 г., стр. 21.
(4) ОВ L 108, 22.4.1974 г., стр. 7.
(5) ОВ L 32, 5.2.1975 г., стр. 26.
(6) ОВ L 102, 15.4.1976 г., стр. 8.
(7) ОВ L 246, 29.8.1981 г., стр. 32.
(8) ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.
(9) ОВ L 123, 29.5 1972 г., стр. 6.
(10) ОВ L 206, 29.7.1978 г., стр. 43.
(11) ОВ L 15, 18.1.1984 г., стр. 28.
(12) ОВ L 257, 10.9.1981 г., стр. 38.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА СПИРАМИЦИН ЧРЕЗ ДИФУЗИЯ В ХРАНИТЕЛНА СРЕДА АГАР-АГАР

1. Цел и обхват

Методът се използва за определяне съдържанието на спирамицин в храните за животни и предварително приготвените смеси. Долната граница на определяне е 1 mg/kg (1ppm) ([1]).

2. Принцип

Пробата се извлича със смес на метанол/фосфат-бикарбонатен буфер при pH 8. Извлекът се декантира или центрофугира и разрежда. Неговата антибиотична активност се определя чрез измерване на дифузията на спирамицин в агар-агар среда, изкуствено заразена в *Micrococcus luteus*. Дифузията се показва чрез формиране на зони на инхибиране на микроорганизмите. Приема се, че диаметърът на тези зони е правопропорционален на логаритъма на антибиотичната концентрация в обхвата на използваните антибиотични концентрации.

3. Микроорганизъм: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 834, NCIB 8553)

3.1. *Поддържане на изходна култура*

В тръби, съдържащи културална хранителна среда (4.1), се посява *Micrococcus luteus* и се слага в инкубатор за 24 часа при 30 °C. Културата се съхранява в хладилник при около 4 °C. Слага се отново в инкубатор на всеки 2 седмици.

3.2. *Приготвяне на бактериалната суспензия* ([a])

Взема се продуктът на свежа хранителна среда агар-агар (3.1) с 2 до 3 ml разтвор на натриев хлорид (4.3). Тази суспензия се използва, за да се посее в 250 ml културална среда (4.1), съдържаща се в Roux колба и се поставя в инкубатор за 18—20 часа при 30 °C Полученото се слага в 25 ml разтвор на натриев хлорид (4.3) и се разбърква. Суспензията се разрежда до 1/10 с разтвор на натриев хлорид (4.3). Прозрачността на суспензията трябва да бъде около 75 %, измерена при 650 nm в клетка 1 cm, спрямо разтвор на натриев хлорид (4.3). Тази суспензия може да се съхранява една седмица при около 4 °C.

4. Културална среда и реактиви

4.1. *Културална среда* ([b])

Месен пептон	6,0 g
Триптон	4,0 g
Екстракт от дрожди	3,0 g
Месен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Вода	1000 ml

pH 6,5 до 6,6 (след стерилизация).

4.2. *Културална среда за извършване на анализа* ([c])

Триптон	5,0 g
Екстракт от дрожди	4,0 g
Месен екстракт	3,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Вода	1000 ml

pH 8,0 (след стерилизация)

([1]) 1 mg спирамицинова основа е еквивалентен на 3200 международни единици (UI)

([a]) Могат да бъдат използвани други методи, в случай че се установи, че при тях се получават сходни бактериални суспензии.

([b]) Може да се използва културална среда от търговски характер със сходен състав, даваща същите резултати

([c]) Може да се използва културална среда от търговски характер със сходен състав, даваща същите резултати.

4.3. *Разтвор на натриев хлорид 0,8 % (w/v).*

Разтварят се 8 g натриев хлорид във вода и се разрежда до 1000 ml; стерилизира се.

4.4. *Фосфатно-бикарбонатен буфер pH 8,0*

Двукалиев водороден фосфат K_2HPO_4	16,7 g
Калиев двуводороден фосфат KH_2PO_4	0,5 g
Натриев водороден карбонат $NaHCO_3$,	20,0 g
Вода до	1000 ml

4.5. *Смес на метанолов фосфатно-бикарбонатен буфер (4.4)*

50/50 (v/v).

4.6. *Стандартна субстанция*

Спирамицин с известна активност (в IU).

5. **Стандартни разтвори**

Разтваря се точно претеглено количество стандартна субстанция (4.6) в сместа (4.5) и се разтваря със същата смес, за да се получи изходен разтвор, съдържащ 1000 IU спирамицин на 1 ml. Съхраняван в запушена колба при 4 °C, този разтвор е стабилен до 5 дни.

От този изходен разтвор се приготвят чрез последователно разреждане със сместа (4.5) следните разтвори:

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

6. **Приготвяне на екстракта и разтворите за извършване на анализ**

6.1. *Извличане*

Претегля се проба от 20 g при храни за животни и от 1 до 20 g при предварително приготвени смеси. Добавят се 100 ml от сместа (4.5) и се разтръсква в продължение на 30 min. Центрофугира се или се декантира и плаващият по повърхността слой се разрежда с разтвора (4.5), за да се получи очаквано съдържание на спирамицин от 1 IU/ml (= U_8).

За очаквани нива на спирамицин, по-ниски от 2,5 mg/kg храна за животни, извличането се извършва, както следва: претеглят се 20 g проба; добавят се 100 ml от сместа (4.5) и се разтръсква в продължение на 30 min; центрофугира се в продължение на няколко min, вземат се 50 ml от плаващия на повърхността разтвор и се изпаряват до около 4 ml при намалено налягане в ротационен изпарител при температура, непревишаваща 40 °C. Остатъкът се разрежда със сместа (4.5), за да се получи очаквано съдържание на спирамицин от 1 IU/ml (= U_8).

6.2. *Разтвори за извършване на анализ*

От разтвор U_8 се приготвят разтвори U_4 (очаквано съдържание: 0,5 IU/ml), U_2 (очаквано съдържание: 0,25 IU/ml) и U_1 (очаквано съдържание: 0,125 IU/ml) чрез последователно разреждане (1 + 1) със сместа (4.5).

7. **Процедура на извършване на анализа**

7.1. *Посяване на средата за изпитване*

В средата за изпитване (4.2) се посява бактериалната суспензия (3.2) при около 50 °C. Чрез предварителни опити в петрита със среда за изпитване (4.2) се определя количеството на бактериалната суспензия, необходимо за да се получат най-големите и най-ясни зони на инхибиране с различна концентрация на спирамицин.

7.2. *Подготовка на петритата*

Дифузията през агар-агар се извършва в петрита с четирите концентрации на стандартния разтвор (S_8, S_4, S_2 и S_1) и четирите концентрации на анализирания разтвор (U_8, U_4, U_2 и U_1). Тези четири концентрации на екстракта и стандарта трябва задължително да се поставят във всяко петри. В тази връзка се избират петрита, достатъчно големи, за да позволят в средата агар-агар да се направят поне 8 отвора с диаметър от 10 до 13 mm и не по-малко от 30 mm между центровете. Тестът трябва да се извърши в петрита, състоящи се от лист стъкло, покрит с алуминиев или пластмасов пръстен, поставен отгоре, с вътрешен диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В петритата се излива част от средата (4.2), посята както в 7.1, за да се получи слой, дебел около 2 mm (60 ml за петри с диаметър 200 mm). Оставя се да се изравни, пробиват се дупките и в тях се обозначават точно премерени обеми от разтворите за анализиране и стандартните разтвори (между 0,10 и 0,15 ml на дупка в зависимост от диаметъра). Всяка концентрация се полага поне 4 пъти, така че на всяко определяне да подлежат на оценка 32 зони на инхибиране.

7.3. *Поставяне в инкубатор*

Петритата се поставят в инкубатор за 16—18 часа при температура 30 ± 2 °C.

8. **Оценяване**

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране с точност до 0,1 mm. Отбелязват се средноаритметичните стойности на измерванията за всяка концентрация върху милиметрова хартия, показваща логаритъма на концентрациите във връзка с диаметрите на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на най-добро съответствие на стандартния разтвор и екстракта.

Определя се „най-точно съответстващата“ точка за стандартното най-ниско ниво (SL), като се използва формулата:

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

Определя се „най-точно съответстващата“ точка за стандартното най-високо ниво (SH), като се използва формулата:

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

По подобен начин се изчисляват и „най-точно съответстващите“ точки за най-ниските нива на екстракта (UL) и най-високите нива на екстракта (UH), като във формулите се заменят S_1, S_2, S_4 и S_8 с U_1, U_2, U_4 и U_8 [1].

Изчислените стойности на SL и SH се нанасят на същата милиметрова хартия и се свързват, за да се получи линията на „най-точно съответствие“ за стандартния разтвор. По подобен начин се нанасят UL и UH и се свързват, за да се получи линията на „най-точно съответствие“ за екстракта.

При отсъствие на интерференции линиите трябва да са паралелни. За практически цели линиите могат да се считат паралелни, ако стойностите (SH – SL) и (UH – UL) не се различават с повече от 10 % от тяхната средна аритметична стойност.

Ако се окаже, че линиите не са паралелни, u_1 и s_1 или u_8 и s_8 могат да се изключат и SL, SH, UL и UH да се изчислят, като се използват алтернативните формули, за да се получат линиите на „най-точно съответствие“:

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

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

и по-подобен начин за UL и UH. Трябва да бъде удовлетворен същият критерий за успоредност. Фактът, че резултатът е изчислен от три нива, трябва да бъде отбелязан в крайния отчет.

[1] Малките букви s и u указват диаметрите на зоните на инхибиране.

Когато линиите се считат за успоредни, се изчислява логаритъмът на относителна активност (log A) посредством една от следните формули в зависимост от това, дали са използвани три или четири нива за оценка на успоредността.

За четири нива

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

За три нива

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

или

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

Активността на пробвания екстракт е равна на активността на релевантния стандарт умножена по A:

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

Ако относителната активност се окаже извън обхвата от 0,5 до 2, анализът се повтаря, като се правят подходящи корекции на концентрациите на екстракта или ако това не е възможно — на стандартните разтвори. Когато относителната активност не може да се доведе в изисквания обхват, всеки получен резултат се счита за приблизителен и това се отбелязва в крайния отчет.

Когато линиите не могат да се считат за успоредни, определянето се повтаря. Ако пак не може да се получи успоредност, определянето се счита за незадоволително.

Резултатите се изразяват в mg спирамицинова база на kg храна за животни.

9. **Повторяемост**

Разликата между резултатите на две успоредни определяния, направени на същата проба от същия лаборант, не трябва да превишава:

— 2 mg/kg в абсолютна стойност — за съдържание на спирамицинова база до 10 g/kg;

— 20 % от най-високата стойност — за съдържание от 10 до 25 mg/kg;

— 5 mg/kg в абсолютна стойност — за съдържание от 25 до 50 mg/kg;

— 10 % от най-високата стойност — за съдържание над 50 mg/kg.