31984L0425

A ZECEA DIRECTIVĂ A COMISIEI din 25 iulie 1984 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

(84/425/CEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor de analiză comunitare pentru controlul oficial al furajelor [1], astfel cum a fost modificată ultima dată de actul de aderare a Greciei, în special articolul 2,

întrucât directiva menționată prevede că inspecția oficială a furajelor prin care se constată respectarea condițiilor prescrise în temeiul actelor cu putere de lege sau a actelor administrative privind calitatea și compoziția furajelor se efectuează în conformitate cu modul de prelevare a probelor și metodele comunitare de analiză;

întrucât Directivele 71/250/CEE [2], 73/46/CEE [3], 74/203/CEE [4], 75/84/CEE [5], 76/372/CEE [6] ale Comisiei, astfel cum au fost modificate ultima dată de Directiva 81/680/CEE [7], Directivele71/393/CEE [8], 72/199/CEE [9], 78/633/CEE [10], modificate ultima dată de Directiva 84/4/CEE [11], precum și de Directiva 81/715/CEE [12] au stabilit deja câteva metode comunitare de analiză; întrucât, ținând seama de stadiul lucrărilor efectuate între timp, este necesar să se adopte o nouă metodă;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre dispun ca analizele prevăzute pentru controalele oficiale ale furajelor din punct de vedere al conținutului lor de spiramicină se efectuează în conformitate cu metoda descrisă în anexă.

Articolul 2

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 30 iunie 1985 și informează Comisia cu privire la aceasta.

Articolul 3

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 25 iulie 1984.

Pentru Comisie

Poul DALSAGER

Membru al Comisiei

---

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

ANEXĂ

DOZAREA SPIRAMICINEI PRIN DIFUZIUNE ÎN MEDIU DE GELOZĂ

1. Obiect și domeniu de aplicare

Metoda permite dozarea spiramicinei în hrană și preamestecuri. Limita interioară de dozare este de 1 mg/kg (1ppm) ([1]).

2. Principiu

Proba se supune unei extracții printr-un amestec de metanol și de tampon fosfat – bicarbonat cu pH 8. Extractul se decantează sau se centrifughează, apoi se diluează. Activitatea antibiotică a extractului se determină prin măsurarea difuziunii spiramicinei într-un mediu de geloză, fertilizat cu *Micrococcus luteus*. Difuziunea se manifestă prin formarea de zone de inhibare a microorganismului. Diametrul acestor zone se consideră ca fiind direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotic pentru gama concentrațiilor utilizate.

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

3.1. *Întreținerea culturii*

Se fertilizează mediul de cultură (4.1.), în tuburi înclinate, cu *Micrococcus luteus*. Se incubează timp de 34 ore la 30 °C, se păstrează în frigider la aproximativ 4 °C și se reînnoiește fertilizarea la fiecare 15 zile.

3.2. *Prepararea suspensiei bacteriene* ([a])

Se recoltează germenii dintr-un tub de geloză (3.1.) preparată recent cu ajutorul a 2 până la 3 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3.). Cu această suspensie se fertilizează 250 ml din mediul de cultură (4.1.) într-o fiolă Roux și se incubează timp de 18–20 de ore la 30 °C. Se recoltează germenii în 25 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3.) și se omogenizează. Se diluează suspensia 1/10 cu ajutorul soluției de clorură de sodiu (4.3). Transmisia luminoasă a suspensiei, măsurată la 650 nm cu o densitate mai mică de 1 cm comparativ cu soluția de clorură de sodiu (4.3), trebuie să fie de aproximativ 75 %. Această suspensie se poate conserva timp de o săptămână la aproximativ 4 °C.

4. Medii de cultură și reactivi

4.1. *Mediu de întreținere a culturii* ([b])

Peptonă din carne	6,0 g
Triptonă	4,0 g
Extract de drojdie	3,0 g
Extract de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g
Geloză	10,0 la 20,0 g
Apă	1 000 ml
pH 6,5 – 6,6 (după sterilizare)	

4.2. *Mediu de bază al dozării* ([b])

Triptonă	5,0 g
Extract de drojdie	4,0 g
Extract de carne	3,0 g
Geloză	10,0 la 20,0 g
Apă	1 000 ml
pH 8,0 (după sterilizare).	

([1]) 1 mg de spiramicină bază echivalează cu 3 200 unități internaționale (UI).

([a]) Se pot utiliza și alte metode, în măsura în care se dovedește că acestea produc suspensii bacteriene analoge.

([b]) Se poate utiliza orice mediu comercial de cultură de compoziție analogă care dă aceleași rezultate.

4.3. *Soluție la 0,8 % (p/t) de clorură de sodiu*

Se dizolvă în apă 8 g de clorură de sodiu, se diluează la 1 000 ml și se sterilizează.

4.4. *Tampon fosfato-bicarbonat, pH 8,0*

Hidrogenofosfat de potasiu, K_2HPO_4	16,7 g
Dihidrogenofosfat de potasiu, KH_2PO_4	0,5 g
Carbonat acid de sodiu, $NaHCO_3$	20,0 g
Apă până la	1 000 ml

4.5. *Amestec de metanol și tampon fosfato-bicarbonat (4.4.)*

50/50 (v/v).

4.6. *Substanță etalon*

Spiramicină cu activitate cunoscută (în UI).

5. **Soluții etalon**

Se dizolvă o cantitate cântărită cu exactitate din substanța etalon (4.6.) în amestec (4.5.) și se diluează cu același amestec pentru a se obține o soluție de bază la 1 000 UI de spiramicină/ml. Păstrată în flacon astupat la 4 °C, această soluție este stabilă timp de 5 zile.

Pornind de la această soluție și folosind diluări succesive cu ajutorul amestecului (4.5.), se pregătesc următoarele soluții:

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

6. **Prepararea extractului și a soluțiilor**

6.1. *Extracția*

Se cântărește o cantitate de eșantion de 20,0 g pentru hrană; de 1,0 – 20,0 g pentru preamestecuri. Se adaugă 100 ml din amestec (4.5.) și se agită timp de 30 de minute. Se centrifughează sau se decantează, apoi se diluează soluția rezultată cu ajutorul amestecului (4.5) pentru a se obține o concentrație estimată de spiramicină de 1 UI/ml (= U_8).

Pentru conținuturile de spiramicină mai mici de 2,5 mg/kg de aliment, extracția se efectuează după cum urmează: se cântărește o cantitate de eșantion de 20,0 g. Se adaugă 100 ml din amestec (4.5.), se agită timp de 30 de minute, apoi se centrifughează câteva minute. Se prelevă 50 ml din soluția rezultată și se evaporă până la aproximativ 4 ml sub presiune redusă, într-un evaporator rotativ, la o temperatură care să nu depășească 40 °C. Se diluează reziduul cu ajutorul amestecului (4.5.) pentru a se obține o concentrație estimată de spiramicină de 1 UI/ml (= U_8).

6.2. *Soluții de extract*

Din soluția U_8 se prepară, prin diluări succesive (1+1), cu ajutorul amestecului (4.5.), soluțiile U_4 (concentrație estimată: 0,5 UI/ml, U_2 (concentrație estimată: 0,25 UI/ml) și U_1 (concentrație estimată: 0,125 UI/ml).

7. **Modalități de dozare**

7.1. *Inocularea mediului de cultură*

Se fertilizează la aproximativ 50 °C mediul de bază al dozării (4.2.) cu ajutorul suspensiei bacteriene (3.2.). Prin încercări preliminare pe tăvițe cu mediu (4.2.), se determină cantitatea de suspensie bacteriană ce permite obținerea, pentru diferitele concentrații de spiramicină. a unor zone de inhibiție care să fie cât mai întinse posibil și care, în același timp, să fie limpezi.

7.2. *Pregătirea cutiilor*

Difuzarea pe geloză se efectuează în cutii cu cele patru concentrații de soluție etalon (S_8, S_4, S_2, S_1) și cele patru concentrații de extract (U_8, U_4, U_2, U_1). În fiecare cutie trebuie să se introducă cele patru concentrații de soluție etalon și de extract. În acest scop, se alege dimensiunea cutiilor în așa fel încât să se facă în mediul de geloză cel puțin 8 cavități cu un diametru de 10 – 13 mm , ale căror centre să nu fie distanțate la mai puțin de 30 mm. În loc de cutii se pot utiliza tăvițe de sticlă plane suspendate cu un inel de aluminiu sau din material plastic cu un diametru de 200 mm și o înălțime de 20 mm.

Se introduce în cutii o cantitate de mediu (4.2.) fertilizat conform pct. 7.1., permițând să se obțină un strat cu o grosime de aproximativ 2 mm (60 ml pentru o cutie cu un diametru de 200 mm). Se lasă să se solidifice, se fac cavitățile și se depun în ele volume exact măsurate din soluțiile etalon și din extract (0,10 la 0,15 ml pe cavitate, în funcție de diametru). Se repetă de cel puțin patru ori pentru fiecare concentrație, astfel încât fiecare determinare să facă obiectul unei evaluări a 32 de zone de inhibare.

7.3. *Incubare*

Cutiile se incubează timp de 16 – 18 ore la 30 °C ± 2 °C.

8. **Evaluare**

Se măsoară diametrul zonelor de inhibare la 0.1 mm presiune. Pentru fiecare concentrație în parte, se înregistrează măsurile medii pe hârtie semi-logaritmică având logaritmul concentrațiilor în fața diametrelor zonelor de inhibare. Se trasează liniile drepte optime pentru soluția etalon și pentru extract procedând, de exemplu, după cum urmează:

Se determină punctul optim al nivelului cel mai scăzut al soluției etalon (SL) cu ajutorul formulei:

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

Se determine punctul optim al nivelului cel mai ridicat al soluției etalon (SH) cu ajutorul formulei:

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

Se determină în același fel punctele optime ale extractului pentru nivelul cel mai scăzut (UL) și nivelul cel mai ridicat (UH), înlocuind S_1, S_2, S_4 și S_8 din formulele de mai sus cu U_1, U_2, U_4 și U_8 [1].

Se înscriu valorile SL și SH pe același grafic. Unind cele două puncte, se obține dreapta optimă pentru soluția etalon. Procedând în același fel pentru UL și UH, se obține dreapta optimă pentru extract.

În absența oricărei interferențe, dreptele ar trebui să fie paralele. În practică, se consideră ca fiind paralele atunci când (SH – SL) și (UH – UL) nu diferă cu mai mult de 10 % față de media lor.

În cazul în care dreptele nu sunt paralele, se pot elimina fie, U_1 și S_1, fie U_8 și S_8. Valorile SL, SH, UL și UH, care permit să se obțină dreptele optime, se calculează cu ajutorul următoarelor formule:

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

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

și cu formule analoge pentru UL și UH. Utilizarea acestei alternative impune respectarea acelorași criterii de paralelism. Obținerea unui rezultat provenind de la trei nivele se menționează pe buletinul de analiză.

[1] Literele minuscule „s" și „u" se referă la diametrele zonelor de inhibiție.

Atunci când dreptele sunt considerate ca fiind paralele, se calculează logaritmul activității relative (log.A) printr-una dintre formulele de mai jos, în funcție de numărul de nivele (4 sau 3) utilizate pentru evaluarea paralelismului.

Pentru 4 niveluri

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

Pentru 3 niveluri

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

sau

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

Activitatea extractului din probă = activitatea etalonului corespunzător x A:

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

În cazul în care activitatea relativă se găsește în afara gamei de valori cuprinse între 0,5 – 2,0, se repetă determinarea procedând la ajustări adecvate ale concentrațiilor extractului sau, eventual, ale soluțiilor etalon. Atunci când această activitate nu poate fi adusă în gama de valori cerute, rezultatul trebuie să fie considerat ca aproximativ și această indicație trebuie să fie notată pe buletinul de analiză.

Atunci când dreptele sunt considerate ca nefiind paralele, se repetă determinarea. În cazul în care paralelismul nu este încă atins, determinarea trebuie să fie considerată ca nesatisfăcătoare.

Rezultatul se exprimă în mg de spiramicină bază pe kg de hrană.

9. **Repetabilitate**

Diferența între rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion prin aceeași analiză nu trebuie să depășească:

— 2 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de spiramicină bază mai mic de 10 mg/kg;

— 20 % din rezultatul cel mai ridicat pentru conținutul de 10 până la 25 mg/kg;

— 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de 25 până la 50 mg/kg;

— 10 % din rezultatul cel mai ridicat pentru conținutul mai mare de 50 mg/kg;