

COMMISSION

DIXIÈME DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 25 juillet 1984

portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel
des aliments des animaux

(84/425/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,vu le traité instituant la Communauté économique
européenne,vu la directive 70/373/CEE du Conseil, du 20 juillet
1970, concernant l'introduction de modes de prélève-
ment d'échantillons et de méthodes d'analyse commu-
nautaires pour le contrôle officiel des aliments des
animaux ⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par l'acte d'adhé-
sion de la Grèce, et notamment son article 2,considérant que la directive susvisée prévoit que les
contrôles officiels des aliments des animaux visant à
constater que les conditions prescrites en vertu des
dispositions législatives, réglementaires ou adminis-
tratives concernant la qualité et la composition des
aliments des animaux sont respectées, sont effectués
selon des modes de prélèvement d'échantillons et des
méthodes d'analyse communautaires ;considérant que les directives 71/250/CEE ⁽²⁾,
73/46/CEE ⁽³⁾, 74/203/CEE ⁽⁴⁾, 75/84/CEE ⁽⁵⁾,
76/372/CEE ⁽⁶⁾ de la Commission, modifiées en dernier
lieu par la directive 81/680/CEE ⁽⁷⁾, les directives
71/393/CEE ⁽⁸⁾, 72/199/CEE ⁽⁹⁾, 78/633/CEE ⁽¹⁰⁾, modi-
fiées en dernier lieu par la directive 84/4/CEE ⁽¹¹⁾, ainsi
que la directive 81/715/CEE ⁽¹²⁾ ont déjà fixé un
certain nombre de méthodes d'analyse communau-
taires ; que, compte tenu de l'état d'avancement destravaux effectués depuis lors, il convient d'arrêter une
nouvelle méthode ;considérant que les mesures prévues dans la présente
directive sont conformes à l'avis du comité permanent
des aliments des animaux,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE :

*Article premier*Les États membres prescrivent que les analyses
prévues pour les contrôles officiels des aliments des
animaux, en ce qui concerne leur teneur en spiramy-
cine, sont effectuées selon la méthode décrite à l'an-
nexe.*Article 2*Les États membres mettent en vigueur les dispositions
législatives, réglementaires et administratives néces-
saires pour se conformer aux dispositions de la
présente directive au plus tard le 30 juin 1985 et ils en
informent la Commission.*Article 3*Les États membres sont destinataires de la présente
directive.

Fait à Bruxelles, le 25 juillet 1984.

Par la Commission

Poul DALSAGER

Membre de la Commission⁽¹⁾ JO n° L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.⁽²⁾ JO n° L 155 du 12. 7. 1971, p. 13.⁽³⁾ JO n° L 83 du 30. 3. 1973, p. 21.⁽⁴⁾ JO n° L 108 du 22. 4. 1974, p. 7.⁽⁵⁾ JO n° L 32 du 5. 2. 1975, p. 26.⁽⁶⁾ JO n° L 102 du 15. 4. 1976, p. 8.⁽⁷⁾ JO n° L 246 du 29. 8. 1981, p. 32.⁽⁸⁾ JO n° L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.⁽⁹⁾ JO n° L 123 du 29. 5. 1972, p. 6.⁽¹⁰⁾ JO n° L 206 du 29. 7. 1978, p. 43.⁽¹¹⁾ JO n° L 15 du 18. 1. 1984, p. 28.⁽¹²⁾ JO n° L 257 du 10. 9. 1981, p. 38.

ANNEXE

DOSAGE DE LA SPIRAMYCINE PAR DIFFUSION SUR GÉLOSE

1. **Objet et domaine d'application**

La méthode permet de doser la spiramycine dans les aliments et les prémélanges. La limite inférieure du dosage est de 1 mg/kg (1 ppm)⁽¹⁾.

2. **Principe**

L'échantillon est soumis à une extraction par un mélange de méthanol et de tampon phosphate-bicarbonate à pH 8. L'extrait est décanté ou centrifugé, puis dilué. L'activité antibiotique de l'extrait est déterminée par mesure de la diffusion de la spiramycine dans un milieu gélosé, ensemencé avec *Micrococcus luteus*. La diffusion se révèle par la formation de zones d'inhibition du micro-organisme. Le diamètre de ces zones est considéré comme étant directement proportionnel au logarithme de la concentration en antibiotique pour la gamme des concentrations utilisées.

3. **Micro-organisme : *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**3.1. *Entretien de la souche*

Ensemencer le milieu de culture (4.1), en tubes inclinés, par *Micrococcus luteus*. Incuber pendant 24 heures à 30 °C, conserver en réfrigérateur à 4 °C environ et renouveler l'ensemencement tous les 15 jours.

3.2. *Préparation de la suspension bactérienne(a)*

Récolter les germes d'un tube de gélose (3.1), de préparation récente, à l'aide de 2 à 3 ml de solution de chlorure de sodium (4.3). Ensemencer avec cette suspension 250 ml du milieu de culture (4.1) dans une fiole de Roux et incuber pendant 18 à 20 heures à 30 °C. Récolter les germes dans 25 ml de solution de chlorure de sodium (4.3) et homogénéiser. Diluer la suspension à 1/10 à l'aide de la solution de chlorure de sodium (4.3). La transmission lumineuse de la suspension, mesurée à 650 nm sous une épaisseur de 1 cm par comparaison avec la solution de chlorure de sodium (4.3) doit être de 75 % environ. Cette suspension peut être conservée une semaine à 4 °C environ.

4. **Milieus de culture et réactifs**4.1. *Milieu d'entretien de la souche(b)*

Peptone de viande	6,0 g
Tryptone	4,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Extrait de viande	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gélose	10,0 à 20,0 g
Eau	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (après stérilisation).	

4.2. *Milieu de base du dosage(b)*

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	4,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Gélose	10,0 à 20,0 g
Eau	1 000 ml
pH 8,0 (après stérilisation).	

⁽¹⁾ 1 mg de spiramycine base équivaut à 3 200 unités internationales (UI).

(a) D'autres méthodes peuvent être utilisées dans la mesure où il est prouvé qu'elles produisent des suspensions bactériennes analogues.

(b) Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

4.3. *Solution à 0,8 % (p/v) de chlorure de sodium*

Dissoudre dans l'eau 8 g de chlorure de sodium, diluer à 1 000 ml et stériliser.

4.4. *Tampon phosphate-bicarbonate, pH 8,0*

Hydrogenophosphate de potassium, K_2HPO_4	16,7 g
Dihydrogenophosphate de potassium, KH_2PO_4	0,5 g
Carbonate acide de sodium, $NaHCO_3$	20,0 g
Eau jusqu'à	1 000 ml

4.5. *Mélange de méthanol et de tampon phosphate-bicarbonate (4.4)*

50/50 (v/v).

4.6. *Substance étalon*

Spiramycine d'activité connue (en UI).

5. **Solutions étalons**

Dissoudre une quantité exactement pesée de la substance étalon (4.6) dans le mélange (4.5) et diluer avec le même mélange pour obtenir une solution mère à 1 000 UI de spiramycine/ml. Conservée en flacon bouché à 4 °C, cette solution est stable pendant cinq jours.

Préparer à partir de cette solution et par dilutions successives à l'aide du mélange (4.5) les solutions suivantes :

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

6. **Préparation de l'extrait et des solutions**6.1. *Extraction*

Peser une quantité d'échantillon de 20,0 g pour les aliments ; de 1,0 à 20,0 g pour les prémélanges. Ajouter 100 ml du mélange (4.5) et agiter durant 30 minutes. Centrifuger ou décantier, puis diluer la solution surnageante à l'aide du mélange (4.5) pour obtenir une concentration présumée en spiramycine de 1 UI/ml (= U_x).

Pour les teneurs en spiramycine inférieures à 2,5 mg/kg d'aliment, effectuer l'extraction comme suit. Peser une quantité d'échantillon de 20,0 g. Ajouter 100 ml du mélange (4.5), agiter durant 30 minutes, puis centrifuger quelques minutes. Prélever 50 ml de la solution surnageante et évaporer jusqu'à 4 ml environ sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 40 °C. Diluer le résidu à l'aide du mélange (4.5) pour obtenir une concentration présumée en spiramycine de 1 IU/ml (= U_x).

6.2. *Solutions de l'extrait*

Préparer à partir de la solution U_x et par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.5) les solutions U_4 (concentration présumée : 0,5 UI/ml), U_2 (concentration présumée : 0,25 UI/ml) et U_1 (concentration présumée : 0,125 UI/ml).

7. **Modalités du dosage**7.1. *Inoculation du milieu de culture*

Ensemencer à 50 °C environ le milieu de base du dosage (4.2) par la suspension bactérienne (3.2). Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu (4.2), déterminer la quantité de suspension bactérienne permettant d'obtenir pour les différentes concentrations en spiramycine des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes.

7.2. *Préparation des boîtes*

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les quatre concentrations de la solution étalon (S_8, S_4, S_2, S_1) et les quatre concentrations de l'extrait (U_8, U_4, U_2, U_1). Chaque boîte doit nécessairement recevoir les quatre concentrations de l'étalon et de l'extrait. À cet effet, choisir la dimension des boîtes de telle sorte qu'on puisse creuser dans le milieu gélosé au moins huit cavités de 10 à 13 mm de diamètre, dont les centres ne sont pas distants de moins de 30 mm. On peut utiliser comme boîtes des plaques de verre planes, surmontées d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire dans les boîtes une quantité du milieu (4.2), ensemencé comme indiqué en 7.1, permettant d'obtenir une couche de 2 mm environ d'épaisseur (60 ml pour une boîte de 200 mm de diamètre). Laisser solidifier, creuser les cavités et y déposer des volumes exactement mesurés des solutions de l'étalon et de l'extrait (0,10 à 0,15 ml par cavité, selon le diamètre). Faire au moins quatre répétitions de chaque concentration de façon que chaque détermination fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

7.3. *Incubation*

Incuber les boîtes pendant 16 à 18 heures à $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

8. **Évaluation**

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition à 0,1 mm près. Pour chaque concentration, enregistrer les mesures moyennes sur papier semi-logarithmique en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites les mieux ajustées pour la solution étalon et pour l'extrait en procédant, par exemple, comme suit.

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus bas de la solution étalon (SL) à l'aide de la formule :

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

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus élevé de la solution étalon (SH) à l'aide de la formule :

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

Déterminer de la même façon les points les plus appropriés de l'extrait pour le niveau le plus bas (UL) et le niveau le plus élevé (UH) en remplaçant s_1, s_2, s_4 et s_8 dans les formules susmentionnées par u_1, u_2, u_4 et u_8 ⁽¹⁾.

Inscrire les valeurs SL et SH sur le même graphique. En joignant les deux points on obtient la droite la mieux ajustée pour la solution étalon. En procédant de la même façon pour UL et UH on obtient la droite la mieux ajustée pour l'extrait.

En l'absence de toute interférence, les droites devraient être parallèles. En pratique, on les considère comme étant parallèles lorsque $(\text{SH} - \text{SL})$ et $(\text{UH} - \text{UL})$ ne diffèrent par de plus de 10 % de leur moyenne.

Si les droites ne sont pas parallèles, on peut éliminer soit u_1 et s_1 , soit u_8 et s_8 . Les valeurs SL, SH, UL et UH permettant d'obtenir les droites les mieux ajustées sont alors calculées à l'aide des formules suivantes :

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

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

et de formules analogues pour UL et UH. L'utilisation de cette alternative impose que les mêmes critères de parallélisme soient respectés. L'obtention d'un résultat provenant de trois niveaux doit être mentionnée sur le bulletin d'analyse.

⁽¹⁾ Les lettres minuscules « s » et « u » se réfèrent aux diamètres des zones d'inhibition.

Lorsque les droites sont considérées comme étant parallèles, calculer le logarithme de l'activité relative ($\log. A$) par l'une des formules ci-après, selon le nombre de niveaux (4 ou 3) utilisés pour l'évaluation du parallélisme.

Pour 4 niveaux

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

Pour 3 niveaux

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

ou

$$(d') \log. A = \frac{(u_2 + u_4 + u_n - s_2 - s_4 - s_n) \times 0,401}{u_n + s_n - u_2 - s_2}$$

Activité de l'extrait de l'échantillon = activité de l'étalon correspondant $\times A$:

$$(U_n = S_n \times A)$$

Si l'activité relative se trouve en dehors de la gamme des valeurs comprises entre 0,5 et 2,0, répéter la détermination en procédant à des ajustements appropriés des concentrations de l'extrait ou, éventuellement, des solutions étalons. Lorsque cette activité ne peut être ramenée dans la gamme des valeurs requises, le résultat doit être considéré comme approximatif et cette indication doit être notée sur le bulletin d'analyse.

Lorsque les droites sont considérées comme n'étant pas parallèles, répéter la détermination. Si le parallélisme n'est toujours pas atteint, la détermination doit être considérée comme non satisfaisante.

Exprimer le résultat en milligrammes de spiramycine base par kilogramme d'aliment.

9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon par le même analyste ne doit pas dépasser :

- 2 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en spiramycine base inférieures à 10 mg/kg ;
- 20 % du résultat le plus élevé pour les teneurs de 10 à 25 mg/kg ;
- 5 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs de 25 à 50 mg/kg ;
- 10 % du résultat le plus élevé pour les teneurs supérieures à 50 mg/kg.