

31984L0425

L 238/34

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

6.9.1984

**IL-KUMMISSJONI**  
**L-GHAXAR DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI**  
**tal-25 ta' Lulju 1984**  
**litistabilixxi metodi tal-Komunita għall-analiżi għall-kontroll uffiċjali tat-tgħam**

(84/425/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jwaqqaf il-Komunita Ekonomika Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE tal-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni ta' metodi tal-Komunita ta' teħid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' tgħam <sup>(1)</sup>, kif emendat l-aħħar mill-Att ta' Shubija tal-Greċja, u partikolarment Artikolu 2 miġjub fih,

Billi dik id-Direttiva teħtieġ li l-kontroll uffiċjali ta' tgħam għall-ghan ta' l-ispezzjoni ta' konformita mal-htigijiet taħt id-dispożizzjonijiet preskritti mill-liġi, regolament jew azzjoni amministrattiva li tikkoncerna l-kwalita u l-komposizzjoni ta' tgħam jitwettaq permezz ta' metodi tal-Komunita ta' teħid u analiżi;

Billi d-Direttivi tal-Kummissjoni 71/250/KEE <sup>(2)</sup>, 73/46/KEE <sup>(3)</sup>, 74/203/KEE <sup>(4)</sup>, 75/84/KEE <sup>(5)</sup>, 76/372/KEE <sup>(6)</sup> kif emendat l-aħħar bid-Direttiva 81/680/KEE <sup>(7)</sup>, Direttivi 71/393/KEE <sup>(8)</sup>, 72/199/KEE <sup>(9)</sup>, 78/633/KEE <sup>(10)</sup>, kif emendat mid-Direttiva 84/4/KEE <sup>(11)</sup>, u d-Direttiva 81/715/KEE <sup>(12)</sup> diġa waqqfu numru ta' metodi ta' analiżi tal-Komunita; billi l-progress tax-xogħol minn dak iż-żmien jagħti l-parir li jiġi adottat metodu għdid;

Billi l-miżuri provvduti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti għat-Tgħam,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

*Artikolu 1*

L-Istati Membri għandhom jeħtieġu li analiżi għal kontrolli uffiċjali għat-tgħam, rigward il-kontenut tagħhom ta' spiramycin jistgħu jitwettqu skond il-metodu deskritt fl-Anness.

*Artikolu 2*

L-Istati Membri għandhom idahhlu fis-seħh il-liġijiet, regolamenti jew dispożizzjonijiet amministrattivi meħtieġa biex jikkonformaw ma' din id-Direttiva sa l-aktar tard it-30 ta' Ġunju 1985 u għandhom jgħarrfu bihom fil-pront lill-Komunita.

*Artikolu 3*

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fil-25 ta' Lulju 1984.

*Għall-Kummissjoni*

Poul DALSAGER

*Membru tal-Kummissjoni*

(1) ĠU L 170, tat-3.8.1970, p.2.

(2) ĠU L 155 tat-12.7.1971, p.13.

(3) ĠU L 83, tat-30.3.1973, p.21.

(4) ĠU L 108, tat-22.4.1974, p.7.

(5) ĠU L 32, tal-5.2.1975, p.26.

(6) ĠU L 102, tal-15.4.1976, p.8.

(7) ĠU L 246, tad-29.8.1981, p. 32.

(8) ĠU L 279, tal-20.12.1971, p. 7.

(9) ĠU L 123, tad-29.5.1972, p. 6.

(10) ĠU L 206, tad-29.7.1978, p. 43.

(11) ĠU L 15, tat-18.1.1984, p. 28.

(12) ĠU L 257, tal-10.9.1981, p.38.

## ANNEX

## STABILIZZAZZJONI TA' SPIRAMYCIN PERMEZZ TA' DIFFUSION F' AGAR MEDIUM

## 1. L-Għan u s-skop

Il-metodu huwa għall-istabilizzazzjoni ta' spiramycin f' tgham u t-tahlit propju (*premixes*). Il-limitu l-iktar baxx ta' stabbilizzazzjoni huwa 1 mg/kg (1 ppm) <sup>(1)</sup>

## 2. Il-priċipju

Il-kampjun huwa estratt permezz ta' tahlita ta' *methanol/phosphate-bicarbonate buffer* f' pH 8.

L-estratt huwa dekantat jew ċentrifugat u mghammed. L-attività antibijotika tiegħu huwa stabbilit permezz tal-kejl tad-*diffusion* f' *agar medium* inokulat b' *Micrococcus luteus*. *Diffusion* huwa muri permezz tal-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni tal-mikro-organizmu. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni huwa mehud li huwa f' proporzjon diretta għall-*logarithm* tal-konċentrazzjoni antibijotika fuq il-firxa ta' konċentrazzjonijiet antibijotiċi wżati.

3. Mikro-organizmu: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

## 3.1 Manutenzjoni ta' stock culture

Inokula tubi li jikkontjenu *slopes* ta' medju ta' kultura (4.1) b' *Micrococcus luteus* u poġġi finkubatur għal 24 siegħa f' temperatura ta' 30 °C. Aħżen il-kultura f'refrigeratur f'temperatura ta' madwar 4 °C. Erga inokula kull gimagħtejn.

3.2 Preparazzjoni tas-sospensjoni batterika <sup>(a)</sup>

Aħsad dak li jitrabba' minn *agar slope* li għadu kemm ġie preparat (3.1) b' 2 sa 3 ml ta' soluzzjoni ta' klorur tas-sodju (4.3). Uża din is-sospensjoni biex tinokula 250 ml ta' *culture medium* (4.1) li jinstab f' *Roux flask* u inkuba għal 18 sa 20 siegħa f' temperatura ta' 30 °C.

Aħsad dak li jitrabba' f' 25 ml ta' soluzzjoni ta' klorur tas-sodju (4.3) u hallat. Għammed is-sospensjoni sa 1/10 b' soluzzjoni ta' klorur tas-sodju (4.3). It-trasmissjoni ta' dawl tas-sospensjoni trid tkun ta' madwar 75 %, mkejla f' 650 nm f' ċellola ta' 1 ċm kontra soluzzjoni ta' klorur tas-sodju (4.3). Din is-sospensjoni tista tinzamm għal gimgha f' temperatura ta' madwar 4 °C.

## 4. Culture media u reagenti

4.1 Culture medium <sup>(b)</sup>

<i>Meat peptone</i>	6,0 g
<i>Tryptone</i>	4,0 g
Estratt tal-ħmira	3,0 g
Estratt tal-laħam	1,5 g
Glukosju	1,0 g
<i>Agar</i>	10,0 sa 20,0 g
Ilma	1,000 ml
pH 6,5 sa 6,6 (wara sterilizzazzjoni)	

*Medju ta' assaġġ* <sup>(b)</sup>

<i>Tryptone</i>	5,0 g
Estratt tal-ħmira	4,0 g
Estratt tal-laħam	3,0 g
<i>Agar</i>	10,0 sa 20,0 g
Ilma	1,000 ml
pH 8,0 (wara sterilizzazzjoni).	

<sup>(1)</sup> Bażi ta' 1 mg spiramycin hija ekwivalenti għal 3 200 unitajiet internazzjonali (UI).

<sup>(a)</sup> Metodi oħra jistgħu jintużaw basta iżda li ġie stabbilit li jagħtu sospensjonijiet batteriċi simili.

<sup>(b)</sup> Kull *culture medium* kummerċjali ta' komposizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati jista' jintuża.

## 4.2 Soluzzjoni ta' klorur tas-sodju 0,8 % (w/v)

Holl 8 g ta' klorur tas-sodju fl-ilma u għammed sa 1 00 ml; sterilizza.

## 4.3 Phosphate-bicarbonate buffer, pH 8,0

Dipotassium hydrogen phosphate K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,7 g
Potassium dihydrogen phosphate KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Sodium hydrogen carbonate Na HCO <sub>3</sub>	20,0 g
Ilma sa	1 000 ml

## 4.5 Tahlita ta' methanol-phosphate buffer (4.4)

50/50 (v/v).

## 4.6 Sustanza standard

Spiramycin ta' attività maghrufa (f' UI).

## 5. Soluzzjonijiet standard

Holl kwantita mkejla b' esattezza tas-sustanza standard (4.6) fit-tahlita (4.5) u għammed bl-istess tahlita biex tikseb soluzzjoni stock li tikkontjeni 1 000 UI spiramycin kull millilitru. Meta maħzun f'fjaskun magħluq b' tapp f' temperatura ta' 4 °C din is-soluzzjoni hija stabbli sa hamest ijiem.

Minn din is-soluzzjoni ta' stock ipprepara permezz ta' tghammad suċċessivi mat-tahlita (4.5) is-soluzzjonijiet li ġejjin:

S8	1	UI/ml
S4	0,5	UI/ml
S2	0,25	UI/ml
S1	0,125	UI/ml

## 6. Preparazzjoni ta' l-estratt u s-soluzzjonijiet ta' l-assaġġ

## 6.1 Estrazzjoni

Iżen kwantita tal-kampjun ta' 20,0 g fil-każ ta' tgham, ta' 1,0 sa 20,0 g għat tahlit propju (*premixes*). Żid 100 ml tat-tahlita (4.5) u hawwad għal 30 minuta. Iċċentrifuga jew iddekanta u għammed is-soluzzjoni *supernatant* mat-tahlita (4.5) biex tikseb l-*spiramycin* mistenni f' kontenut ta' 1 UI/ml (= U8).

Għal livelli mistennija ta' *spiramycin* li huma aktar baxxi minn 2,5 mg/kg ta' tgham l-estrizzjoni trid titwettaq kif ġej. Iżen kwantita tal-kampjun ta' 20,0 g. Żid 100 ml tat-tahlita (4.5) u hawwad għal 30 minuta. Iċċentrifuga għal ftit minuti, hu 50 ml tas-soluzzjoni *supernatant* u evapora għal madwar 4 ml taht pressjoni mnaqqsa f' evaporatur *rotary* f' temperatura li ma taqbiżx l-40 °C. Għammed ir-residwu mat-tahlita (4.5) biex tikseb kontenut mistenni ta' *spiramycin* ta' 1 UI/ml (= U8).

## 6.2 Soluzzjonijiet ta' assaġġ

Minn soluzzjoni U8 ipprepara soluzzjonijiet U4 (kontenut mistenni: 0,5 UI/ml), U2 (kontenut Mistenni: 0,25 UI/ml) u U1 (kontenut mistenni: 0,125 UI/ml) permezz ta' tghamid suċċessiv (1 + 1) mat-tahlita (4.5).

## 7. Proċedura ta' l-assaġġ

## 7.1 Inokulazzjoni tal-medju ta' l-assaġġ

Inokula l-medju ta' l-assaġġ (4.2) bis-sospensjoni batterika (3.2) f' temperatura ta' madwar 50 °C. Permezz ta' provi preliminari fuq *plates* b' medju ta' l-assaġġ (4.2) stabbilixxi l-kwantita ta' sospensjoni batterika meħtieġa biex tagħti ż-żoni li huma l-akbar u l-aktar ċari ta' inibizzjoni bil-konċentrazzjonijiet varji ta' *spiramycin*.

## 7.2 Preparazzjoni tal-plates

*Diffusion* mill-*agar* jitwettaq f' *plates* bl-erba konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni *standard* (S8, S4, S2, S1) u l-erba konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni ta' l-assaġġ (U8, U4, U2, U1). Dawn l-erba konċentrazzjonijiet ta' estratt u *standard* jinhtieġu li jitpoġġew f' kull *plate*. Għal dan il-ghan, għażel *plates* li huma kbar biżżejjed biex ihallu mill-inqas tmien toqbiet b' dijametru ta' 10 sa 13 mm u mhux inqas minn 30 mm bejn iċ-ċentri li jridu jsiru fil-medju tal-*agar*. It-test jista' jitwettaq fuq *plates* li jikkonsistu minn biċċa ħġieġ b' ċirku ta' l-aluminju jew tal-plastik impoġġija fuq, dijametru ta' 200 mm u għolja 20 mm.

Ferra' għal għol *plates* kwantita tal-medju (4.2), inokulat kif spjegat f' 7.1, biex tikseb saff ta' ħxuna ta' madwar 2 mm (60 ml għal *plate* ta' dijametru 200 mm). Halliha toqghod f' pożizzjoni livellata, taqqab it-toqbiet u poġġi go fihom volumi mkejla bl-eżatt ta' soluzzjonijiet ta' assaġġ u *standard* (bejn 0,10 u 0,15 ml kull toqba, skond id-dijametru). Applika kull konċentrazzjoni mill-inqas erba darbiet biex kull stabbilizzazzjoni hija suġġetta għal evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

## 7.3 Inkubazzjoni

Poġġi l-*plates* f' inkubatur għal 16 sa 18-il siegħa f' temperatura ta'  $30 \pm 2$  °C.

## 8. Evalwazzjoni

Kejjel id-dijametru taż-żoni ta' inibizzjoni sa' l-egreb 0,1 mm. Irrekordja l-kejl medju għal kull konċentrazzjoni fuq karta grafika *semi-logarithmic* u uri l-*logarithm* tal-konċentrazzjonijiet rigward id-dijametru taż-żoni ta' inibizzjoni. Pinġi (*plot*) il-linji li joqghodu l-ahjar ta' kemm is-soluzzjoni *standard* kif ukoll l-estratt, per eżempju kif muri hawn taht.

Stabbilixxi l-punt "li joqghod l-ahjar" għall-livell *standard* l-aktar baxx (SL) permezz tal-formula:

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

Stabbilixxi l-punt "li joqghod l-ahjar" għall-livell *standard* l-aktar għoli (SH) permezz tal-

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

Bl-istess mod ikkalkula l-punti "li joqghodu l-ahja" r għall-livell ta' estratt l-aktar baxx (UL) u l-livell ta' l-estratt l-aktar għoli (UH) billi tissostitwixxi u1, u2, u4, u8 għal s1, s2, s4, s8 fil-formuli li hawn fuq (1).

Irrekordja il-valuri kalkolati ta' SL u SH fuq l-istess karta grafika u għaqqadhom biex jagħtu l-linja "li toqghod l-ahjar" għas-soluzzjoni *standard*. Bl-istess mod irrekordja UL u UH u għaqqadhom biex jagħtu l-linja "li toqghod l-ahjar" għall-estratt.

Fl-assenza ta' xi interferenza il-linji għandhom ikunu paralleli. Għal għanijiet aktar prattiċi il-linji jistgħu ikunu kunsidrati paralleli jekk il-valuri (SH — SL) u (UH — UL) ma jkollhomx differenza ta' aktar minn 10 % mill-valur medju tagħhom.

Jekk jinstab li l-linji mhumiex paralleli jew u1 u s1 jew u8 u s8 jistgħu jitnehhew u SL, SH, UL, UH kalkolati permezz tal-metodu alternattiv, biex tikseb linji "li joqghodu l-ahjar" alternattivi:

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

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

u bl-istess mod għal UL u UH. L-istess kriterji ta' paralleliżmu għandhom jiġu sodisfatti. Il-fatt li r-rizultat ġie kalkolat minn tlett livelli għandu jiġi notat fir-rapport finali.

(1) L-ittri ż-żgħhar "s" u "u" jirreferu għad-dijametru taż-żoni ta' inibizzjoni.

Meta l-linji huma kkunsidrati bhala parallelli, ikkalkula l-*logaritmu* tal-attività relattiva (log A) permezz ta' wahda mill-formuli li ġejjin, skond jekk intużawx tliet jew erba' livelli għall-istima ta' paralleliżmu.

Għal erba' livelli

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

Għal tliet livelli

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

jew

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

Attività tal-estratt tal-kampjun = attività ta' l-*istandard* rilevanti  $\times$  A

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

Jekk l-attività relattiva tinstab li hija barra mill-firxa ta' 0,5 sa 2,0, imbagħad irrepiti l-assaġġ b' aġġustamenti xierqa lill-konċentrazzjonijiet ta' l-estratt jew, jekk dan mhuwiex possibbli, lis-soluzzjonijiet *standard*. Meta l-attività relattiva ma tistax tasal sal-firxa meħtieġa, kull riżultat miksub irid jitqies bhala approssimattiv u dan irid jiġi notat fir-rapport finali.

Meta l-linji jitqiesu bħal mhux parallelli, irrepiti l-istabbilizzazzjoni. Jekk xorta wahda paralleliżmu ma jinkisibx, l-istabbilizzazzjoni trid titqies bhala mhux sodisfaċenti.

Aġhti r-riżultat f' milligrammi ta' bażi ta' spiramycin kull kilogramma ta' tġham.

## 9. Repetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ stabbilizzazzjonijiet parallelli mwettqa fuq l-istess kampjun permezz ta' l-istess analista m' għandhiex taqbeż:

- 2 mg/kg, f' valur assolut, għal kontenuti ta' bażi ta' spiramycin sa 10 mg/kg.
- 20 % relatata mal-valur l-aktar għoli għal kontenuti ta' 10 sa 25 mg/kg.
- 5 mg/kg, f' valur assolut, għal kontenuti ta' 25 sa 50 mg/kg.
- 10 % relatata mal-valur l-aktar għoli għal kontenuti l fuq minn 50 mg/kg.