

31984L0425

L 238/34

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

6.9.1984

**DZIESIĄTA DYREKTYWA KOMISJI**  
**z dnia 25 lipca 1984 r.**  
**ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz**

(84/425/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz <sup>(1)</sup>, ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia Grecji, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa stawia wymóg, aby urzędowa kontrola pasz była przeprowadzana przy użyciu wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów sprawdzania zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych lub administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

w dyrektywach Komisji 71/250/EWG <sup>(2)</sup>, 73/46/EWG <sup>(3)</sup>, 74/203/EWG <sup>(4)</sup>, 75/84/EWG <sup>(5)</sup>, 76/372/EWG <sup>(6)</sup>, ostatnio zmienionych dyrektywą 81/680/EWG <sup>(7)</sup>, dyrektywach 71/393/EWG <sup>(8)</sup>, 72/199/EWG <sup>(9)</sup>, 78/633/EWG <sup>(10)</sup>, ostatnio zmienionych dyrektywą 84/4/EWG <sup>(11)</sup> oraz w dyrektywie 81/715/EWG <sup>(12)</sup> ustanowiono już szereg metod analizy; ze względu na dokonane od tamtej pory postępy prac zalecane byłoby przyjęcie nowych metod;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

*Artykuł 1*

Państwa Członkowskie wymagają, aby analizy do celów urzędowej kontroli pasz w odniesieniu do zawartości spiramycyny były przeprowadzane zgodnie z metodą opisaną w Załączniku.

*Artykuł 2*

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie, najpóźniej do dnia 30 czerwca 1985 r., przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

*Artykuł 3*

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 25 lipca 1984 r.

*W imieniu Komisji*

Poul DALSGER

*Członek Komisji*

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

<sup>(2)</sup> Dz.U. L 155 z 12.7.1971, str. 13.

<sup>(3)</sup> Dz.U. L 83 z 30.3.1973, str. 21.

<sup>(4)</sup> Dz.U. L 108 z 22.4.1974, str. 7.

<sup>(5)</sup> Dz.U. L 32 z 5.2.1975, str. 26.

<sup>(6)</sup> Dz.U. 102 z 15.4.1976, str. 8.

<sup>(7)</sup> Dz.U. L 246 z 29.8.1981, str. 32.

<sup>(8)</sup> Dz.U. L 279 z 20.12.1971, str. 7.

<sup>(9)</sup> Dz.U. L 123 z 29.5.1972, str. 6.

<sup>(10)</sup> Dz.U. L 206 z 29.7.1978, str. 43.

<sup>(11)</sup> Dz.U. L 15 z 18.1.1984, str. 28.

<sup>(12)</sup> Dz.U. L 257 z 10.9.1981, str. 38.

## ZAŁĄCZNIK

## OZNACZANIE SPIRAMYCYN Y POPRZEZ DYFUZYJĘ NA PODŁOŻU AGAROWYM

## 1. Cel i zakres

Metoda służy oznaczaniu spiramycyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczenia to 1 mg/kg (1 ppm) <sup>(1)</sup>

## 2. Zasada

Próbka jest lęgowana za pomocą mieszaniny metanolu/roztworu buforowego będącego wodorowęglanem fosforanowym, o współczynniku pH 8. Ekstrakt jest dekantowany bądź odwirowywany i rozcieńczany. Jego aktywność antybiotykowa jest oznaczana poprzez pomiar dyfuzji spiramycyny w podłożu agaru posianym *Micrococcus luteus*. Dyfuzję objawia się tworzeniem stref hamujących rozwój mikroorganizmów. Przyjmuje się, że średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyków w zakresie zastosowanych stężeń antybiotyków.

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

## 3.1. Utrzymanie kultury macierzystej

Dokonać posiewu *Micrococcus luteus* na pożywce umieszczonej w probówkach (ppkt 4.1) i inkubować drobnoustroje przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Przechowywać w lodówce w temperaturze około 4 °C. Dokonywać posiewu co dwa tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej <sup>(a)</sup>

Zebrać przyrost ze świeżo przygotowanej powierzchni agaru (ppkt 3.1) za pomocą 2-3 ml roztworu chlorku sodowego (ppkt 4.3). Użyć niniejszą zawiesinę do posiania 250 ml pożywki (ppkt 4.1), zawartej w kolbie Rouksa, i inkubować 18-20 godzin w temperaturze 30 °C. Zebrać przyrost w 25 ml roztworu chlorku sodowego (ppkt 4.3) i wymieszać. Rozcieńczyć roztwór dziesięciokrotnie za pomocą roztworu chlorku sodowego (ppkt 4.3). Transmisja światła zawiesiny powinna przechodzić przez zawiesinę, zmierzona przy 650 nm, w naczynku 1 cm w stosunku do roztworu chlorku sodowego (ppkt 4.3), powinna wynosić około 75 %. Zawiesina ta może być przechowywana przez tydzień w temperaturze około 4 °C.

## 4. Pożywki i odczynniki

4.1. Pożywka <sup>(b)</sup>

Pepton mięsa	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt z drożdży	3,0 g
Ekstrakt z mięsa	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Woda	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (po sterylizacji).	

4.2. Odczynnik do oznaczenia <sup>(b)</sup>

Trypton	5,0 g
Ekstrakt drożdży	4,0 g
Ekstrakt z mięsa	3,0 g
Agar	10,0-20,0 g
Woda	1 000 ml
pH 8.0 (po sterylizacji).	

<sup>(1)</sup> 1 mg roztworu bazowego spiramycyny równa się 3 200 jednostkom międzynarodowym (IU).

<sup>(a)</sup> Mogą być stosowane inne metody pod warunkiem, że ustalono, że dają one takie same zawiesiny bakteryjne.

<sup>(b)</sup> Może być użyta dowolna inna, dostępna w handlu, pożywka o podobnym składzie i dająca takie same rezultaty.

## 4.3. 0,8-procentowy (stężenie wagowe) roztwór chlorku sodowego

Rozpuścić 8 g chlorku sodowego w wodzie i rozcieńczyć do 1 000 ml; poddać sterylizacji.

## 4.4. Buforowy roztwór wodorowęglanu fosforanu, pH 8,0

Wodorofosforan dwupotasowy $K_2HPO_4$	16,7 g
Dwuwodorofosforan potasu $KH_2PO_4$	0,5 g
Wodorowęglan sodu $NaHCO_3$	20,0 g
Woda do	1 000 ml

## 4.5. Mieszanina roztworu buforowego wodorowęglanu fosforanu (ppkt 4.4)

50/50 (objętościowo/objętościowo).

## 4.6. Substancja wzorcowa

Spiramycyna o znanej aktywności (w jednostkach międzynarodowych).

## 5. Roztwory wzorcowe

Rozpuścić dokładnie odważoną ilość substancji wzorcowej (ppkt 4.6) w mieszaninie (ppkt 4.5) i rozcieńczyć tę samą mieszaniną, aby uzyskać roztwór podstawowy zawierający 1 000 jednostek międzynarodowych spiramycyny na mililitr. Roztwór ten przechowywany w zakorkowanej kolbie w temperaturze 4 °C jest stabilny przez pięć dni.

Na bazie tego roztworu, rozcieńczając go stopniowo za pomocą mieszaniny (ppkt 4.5), należy przygotować następujące roztwory:

$S_8$	1	j.m./ml
$S_4$	0,5	j.m./ml
$S_2$	0,25	j.m./ml
$S_1$	0,125	j.m./ml

## 6. Przygotowanie ekstraktu i roztworów do oznaczania

## 6.1. Ekstrakcja

Odważyć próbkę 20,0 g w przypadku pasz oraz 1,0-20,0 g w przypadku premiksów. Dodać 100 ml mieszaniny (ppkt 4.5) i potrząsać przez 30 minut. Odwirować lub dekantować, a ciecz zlaną z nad osadu rozcieńczyć mieszaniną (ppkt 4.5), aby uzyskać oczekiwaną zawartość spiramycyny wynoszącą 1 j.m./ml (=  $U_8$ ).

W przypadku oczekiwanych zawartości spiramycyny poniżej 2,5 mg/kg paszy proces ekstrakcji musi być przeprowadzony w następujący sposób. Należy odważyć próbkę 20,0 g. Dodać 100 ml mieszaniny (ppkt 4.5) i potrząsać przez 30 minut. Odwirować przez kilka minut, wziąć 50 ml cieczy zlanej z nad osadu i odparować do objętości około 4 ml w warunkach zmniejszonego ciśnienia w obrotowej wyparce w temperaturze 40 °C. Pozostałości należy rozcieńczyć mieszaniną (ppkt 4.5), aby uzyskać oczekiwaną zawartość spiramycyny wynoszącą 1 j.m./ml (=  $U_8$ ).

## 6.2. Roztwory do oznaczania

Z roztworu  $U_8$  przygotować roztwory  $U_4$  (zakładana zawartość: 0,5 j.m./ml),  $U_2$  (zakładana zawartość: 0,25 j.m./ml) oraz  $U_1$  (zakładana zawartość: 0,125 j.m./ml) w drodze kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) za pomocą mieszaniny (ppkt 4.5).

## 7. Procedura oznaczania

## 7.1. Posiew odczynnika do oznaczania

Dokonać posiewu odczynnika do oznaczania (ppkt 4.2) za pomocą zawiesiny bakteryjnej (ppkt 3.2) w temperaturze około 50 °C. Za pomocą wstępnych prób na płytkach z odczynnikiem do oznaczania (ppkt 4.2) ustalić ilość zawiesiny bakteryjnej niezbędnej do uzyskania największych i najczystszych stref hamujących reakcję przy różnych wielkościach stężenia spiramycyny.

### 7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzję w agarze wykonuje się na płytkach z czterema stężeniami roztworów wzorcowych ( $S_8, S_4, S_2, S_1$ ) oraz z czterema stężeniami roztworu do oznaczania ( $U_8, U_4, U_2, U_1$ ). Powyższe cztery stężenia ekstraktu i wzorca muszą być koniecznie umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać odpowiednio duże płytki dla umożliwienia wykonania co najmniej ośmiu otworów o średnicy 10-13 mm i nie mniej niż 30 mm między środkami, w podłożu agarowym. Próba może być wykonana na płytkach szklanych z pierścieniem z aluminium lub tworzywa sztucznego umieszczonym na górnej powierzchni, o średnicy 200 mm i 20 mm wysokości.

Do płytek wlać odpowiednią ilość odczynnika (ppkt 4.2), posianego zgodnie z opisem w ppkt 7.1, aby uzyskać 2-mm warstewkę (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Pozostawić przez chwilę do ustalenia poziomu powierzchni, następnie naciąć otwory i umieścić w nich dokładnie odmierzone ilości roztworów do oznaczania i wzorcowych (0,10-0,15 ml na otwór, zgodnie ze średnicą). Zastosować każde stężenie co najmniej cztery razy, tak aby każde oznaczenie podlegało ocenie 32 stref hamujących.

### 7.3. Inkubacja

Inkubować płytki 16-18 godzin w temperaturze  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 8. Ocena

Zmierzyć średnicę stref hamujących z dokładnością do 0,1 mm. Zapisać średnie wartości pomiarów dla każdego stężenia na papierze półlogarytmicznym, pokazując logarytm ze stężeń w zależności do średnicy stref hamujących. Wykreślić linie o najlepszej zgodności zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu, na przykład jak poniżej.

Wyznaczyć punkt o najlepszej zgodności dla najniższego poziomu wzorcowego (S, stosując następujący wzór:

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

Wyznaczyć punkt o najlepszej zgodności dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH), stosując następujący wzór:

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

W podobny sposób należy obliczyć punkty o najlepszej zgodności dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), wstawiając w powyższych wzorach w miejsce wartości  $s_1, s_4$  i  $s_8$  wartości  $u_1, u_2$  i  $u_4$  <sup>(1)</sup>.

Zapisać obliczone wartości SL i SH na tym samym papierze milimetrowym i połączyć je linią, łączącą punkty o najlepszej zgodności dla wzorcowego roztworu. W podobny sposób zapisać wartości UL i UH na papierze milimetrowym i połączyć je, uzyskując linię łączącą punkty o najlepszej dla ekstraktu.

W przypadku braku jakichkolwiek zakłóceń linie powinny być równoległe. Do celów praktycznych linie można uznać za równoległe, jeśli wartości (SH-SL) oraz (UH-UL) nie odbiegają więcej niż 10 % od ich wartości średniej.

Jeśli okaże się, że wykresy nie są równoległe, to albo  $u_1$  i  $s_1$  lub  $u_8$  i  $s_8$  mogą być odrzucone, a wartości SL, SH, UL oraz UH obliczone przy użyciu alternatywnego wzoru, który powinien dać linie łączące punkty o najlepszej zgodności:

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

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

podobnie dla wartości UL i UH. Alternatywne linie, łączące punkty o najlepszej zgodności, powinny być sprawdzone pod kątem równoległości, tak jak poprzednio. Fakt, że wyniki zostały otrzymane przy użyciu trzech różnych poziomów, należy odnotować w sprawozdaniu końcowym.

<sup>(1)</sup> Małe litery „s” i „u” odnoszą się do średnic stref hamujących.

Kiedy linie zostaną uznane za równoległe, obliczyć logarytm względnej aktywności (log. A), stosując wzór podany poniżej, w zależności od tego, czy do oceny równoległości zastosowano trzy lub też cztery poziomy.

Dla czterech poziomów

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

lub

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

lub

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

Rzeczywista aktywność = aktywność domniemana × aktywność względna A

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

Jeśli okaże się, że względna aktywność nie mieści się w przedziale 0,5-2,0, powtórzyć procedurę oznaczenia po odpowiednim skorygowaniu stężeń ekstraktu lub, jeżeli nie jest to możliwe, to roztworów wzorcowych. Gdy nie można osiągnąć wartości względnej aktywności w wymaganym zakresie, to dowolny uzyskany wynik powinien być wzięty pod uwagę jako wynik przybliżony, co należy odnotować w sprawozdaniu końcowym.

W przypadku gdy linie nie są równoległe, powtórzyć oznaczenie. Jeśli nadal linie wykresów nie będą równoległe, oznaczenie uznaje się za niezadowolające.

Wynik podaje się w miligramach bazowej spiramycyny na kilogram paszy.

#### 9. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych na tej samej próbie, przez tego samego analityka, nie powinna przekraczać:

- 2 mg/kg, w wartościach bezwzględnych, dla zawartości roztworu bazowego spiramycyny do 10 mg/kg,
- 20 % w przypadku najwyższej zawartości spiramycyny w przedziale 10-25 mg/kg,
- 5 mg/kg, w wartościach bezwzględnych, dla zawartości spiramycyny w przedziale 25-50 mg/kg,
- 10 % w przypadku najwyższej zawartości powyżej 50 mg/kg.