

ДЕСЕТА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 25 юли 1984 година

относно въвеждане на методи за анализ на **Общността за провеждането на официален контрол на храните за животни**

(84/425/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждане на методи на **Общността за проби и анализ за официален контрол върху храните за животни**¹, последно изменена с Акта за присъединяване на Гърция, и по-специално член 2 от него,

като има предвид, че тази директива изисква официалният контрол на храните за животни за проверка на съответствието с изискванията, предвидени със закон, подзакон или административен акт, по отношение на качеството им и състава да се извършва въз основа на методите на **Общността за вземане на проби и анализ**;

като има предвид, че Директиви 71/250/ЕИО², 73/46/ЕИО³, 74/203/ЕИО⁴, 75/84/ЕИО⁵, 76/372/ЕИО⁶ на Комисията, последно изменени с Директива 81/680/ЕИО⁷, и Директиви 71/393/ЕИО⁸, 72/199/ЕИО⁹, 78/633/ЕИО¹⁰, последно изменени с Директива 84/4/ЕИО¹¹, и Директива 81/715/ЕИО¹² вече са предвидили редица методи на **Общността за анализ**; като има предвид, че с оглед на напредъка в работата е препоръчително да се приеме нов метод;

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

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

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

Член 2

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.

Държавите-членки въвеждат в сила необходимите закони, подзаконови или административни разпоредби, 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 DALSGER
Член на Комисията

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)¹³.

2. Принцип

Пробата се извлича със смес на метанол/фосфат-бикарбонатен буфер при рН 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 *Microccus 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: *Microccus luteus* ATCC 9341 (NCTC 834, NCIB 8553)

3.1. Поддържане на изходна култура

В тръби, съдържащи културална хранителна среда (4.1), се посява *Microccus luteus* и се слага в инкубатор за 24 часа при 30 °С. Културата се съхранява в хладилник при около 4 °С. 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 °С. 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 °С.

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 |

¹³ 1 mg спирамицинова основа е еквивалентен на 3 200 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.

| | |
|----------------|----------------|
| Месен екстракт | 1,5 g |
| Глюкоза | 1,0 g |
| Агар-агар | 10,0 до 20,0 g |
| Вода | 1 000 ml |

pH 6,5 до 6,6 (след стерилизация).

4.2. Културална среда за извършване на анализа⁶⁾

| | |
|--------------------|----------------|
| Триптон | 5,0 g |
| Екстракт от дрожди | 4,0 g |
| Месен екстракт | 3,0 g |
| Агар-агар | 10,0 до 20,0 g |
| Вода | 1 000 ml |

pH 8,0 (след стерилизация)

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

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

4.4. Фосфатно-бикарбонатен буфер, pH 8,0

| | |
|--|---------|
| Двукалийен 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 (w/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⁾ Може да се използва културална среда от търговски характер със сходен състав, даваща същите резултати.

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 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). Остава 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 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:

$$SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - S_8}{10}$$

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

$$SH = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 - S_1}{10}$$

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 ¹⁴

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“

$$\begin{array}{l} \text{а) } SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6} \\ \text{б) } SH = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6} \end{array}$$

¹⁴ Малките букви „s” и „u” се отнасят за диаметрите на зоните на инхибиране.

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

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 –

$$\text{в) Log } A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

За три нива -

$$\text{г) Log } A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \cdot 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

или

$$\text{г) Log } A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

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 съдържания 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 съдържания над 50 mg/kg.