

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2003/126/EF**af 23. december 2003****om analysemetoder til bestemmelse af animalske bestanddele med henblik på officiel kontrol af foderstoffer****(EØS-relevant tekst)**

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

Artikel 1

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20 juli 1970 om indførelse af fælles prøveudtagnings- og analysemetoder til kontrol af levnedsmidler ⁽¹⁾, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Ifølge direktiv 70/373/EØF skal den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning, er opfyldt, foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder.
- (2) Bestemmelser om mærkning af foderstoffer og krav om forbud mod anvendelsen af visse typer af animalske proteiner i foderstoffer til visse kategorier af dyr gør det nødvendigt at fastlægge pålidelige analysemetoder for at fastslå deres tilstedeværelse og i givet fald deres procentdel.
- (3) Den metode, der er beskrevet i Kommissionens direktiv 98/88/EF af 13. november 1998 om retningslinjer for identificering af og skøn over indhold af animalske bestanddele i foderstoffer ved mikroskopi med henblik på officiel kontrol af foderstoffer ⁽²⁾, er i øjeblikket den eneste validerede metode til kontrol af tilstedeværelse af animalske proteiner, herunder proteiner, der er behandlet ved 133 °C/3 bar/20 min., i foderstoffer.
- (4) For nylig viste en ringtest med henblik på bestemmelse af forarbejdede animalske proteiner, at forskellig anvendelse af mikroskopitesten i direktiv 98/88/EF resulterede i betydelige forskelle i metodens følsomhed, specificitet og nøjagtighed. For at harmonisere og forbedre bestemmelsen af forarbejdede animalske proteiner bør bestemmelserne vedrørende mikroskopimetoden specificeres yderligere og gøres bindende. Det er nødvendigt at sikre, at de, der anvender metoden, har en hensigtsmæssig uddannelse, eftersom resultatet afhænger af vedkommendes færdigheder.
- (5) Direktiv 98/88/EF bør derfor erstattes.
- (6) De i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed —

Medlemsstaterne fastsætter, at hvis der foretages en officiel analyse af foderstoffer med henblik på officiel kontrol af tilstedeværelse af, identificering af og/eller skøn over indholdet af animalske bestanddele i foderstoffer inden for rammerne af det samordnede kontrolprogram på foderstofområdet i henhold til Rådets direktiv 95/53/EF ⁽³⁾, skal den foretages i overensstemmelse med bestemmelserne i bilaget til nærværende direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterne sikrer, at laboratorier, der foretager officiel kontrol af tilstedeværelsen af animalske bestanddele i foderstoffer, regelmæssigt deltager i præstationsprøvninger af analysemetoderne, og at laboratoriepersonalet, der foretager analyser, har den fornødne uddannelse.

Artikel 3

Direktiv 98/88/EF ophæves.

Henvisninger til det ophævede direktiv betragtes som henvisninger til nærværende direktiv.

Artikel 4

1. Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme dette direktiv senest den 1. juli 2004. De meddeler straks Kommissionen teksten til disse bestemmelser og en sammenligningstabel, som viser sammenhængen mellem de pågældende bestemmelser og dette direktiv.

Disse love og administrative bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen de nationale retsfor skrifter, som de udsteder på det område, der er omfattet af dette direktiv.

⁽¹⁾ EFT L 170 af 3.8.1970, s. 2. Senest ændret ved forordning (EF) nr. 807/2003 (EUT L 122 af 16.5.2003, s. 36).

⁽²⁾ EFT L 318 af 27.11.1998, s. 45.

⁽³⁾ EFT L 265 af 8.11.1995, s. 17. Senest ændret ved direktiv 2001/46/EF (EFT 234 af 1.9.2001, s. 55).

Artikel 5

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Artikel 6

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 23. december 2003.

På Kommissionens vegne

David BYRNE

Medlem af Kommissionen

BILAG

Betingelser for påvisning af, identificering af eller skøn over indhold af animalske bestanddele i foderstoffer ved mikroskopi**1. Formål og anvendelsesområde**

Disse betingelser anvendes ved påvisning af indhold af animalske bestanddele (defineret som produkter fra forarbejdning af kroppe og kropsdele af pattedyr, fjerkræ og fisk) i foderstoffer ved hjælp af mikroskopi inden for rammerne af det samordnede kontrolprogram på foderstofområdet i henhold til Rådets direktiv 95/53/EF. Forudsat at metoderne i dette bilag bruges i forbindelse med alle officielle prøver, kan der foretages endnu en prøve ved at anvende varierende eller alternative metoder for at forbedre påvisningen af visse typer animalske bestanddele eller yderligere specificere de animalske bestanddeles oprindelse. Endvidere kan der anvendes en varierende protokol ved undersøgelse af visse særlige animalske bestanddele, som f.eks. plasma eller knogler i talg (se også punkt 9), hvis disse analyser foretages som supplement til analyserne i det samordnede kontrolprogram.

2. Følsomhed

Afhængigt af arten af de animalske bestanddele kan der påvises meget små mængder (< 0,1 %) i foderstoffer.

3. Princip

En repræsentativ prøve, der er udtaget i overensstemmelse med bestemmelserne i Kommissionens direktiv 76/371/EØF af 1. marts 1976 om fastsættelse af fællesskabsmåder for udtagning af prøver til den officielle kontrol med foderstoffer⁽¹⁾, og som har gennemgået en passende forberedelse, anvendes til identificeringen. Følgende protokol egner sig til håndtering af fødevarer med lavt vandindhold. Foder med et vandindhold på over 14 % skal tørres (kondenseres) inden håndteringen. Særligt foder eller særlige fodermidler (f.eks. fedtstoffer og olier) skal behandles på en speciel måde (se punkt 9). Animalske bestanddele identificeres ud fra typiske kendetegn, der kan identificeres ved mikroskopi (bl.a. muskelfibre og andre kødpartikler, brusk, knogler, horn, hår, børster, fjer, æggeskaller, fiskeben og skæl). Identificeringen skal foretages både på sigtefraktionen (6.1) og det koncentrerede sediment (6.2) af prøven.

4. Reagenser**4.1. Immersionsvæsker**

4.1.1. Chloralhydrat (vandigt, 60 % w/v)

4.1.2. Lud (NaOH 2,5 % w/v eller KOH 2,5 % w/v) for sigtefraktioner

4.1.3. Paraffinolie eller glycerol (viskositet: 68-81) for mikroskopiobservationer i sedimentet

4.2. Skyllevæsker

4.2.1. Alkohol, 96 %

4.2.2. Acetone

4.3. Koncentreringsmiddel

4.3.1. Tetrachlorethylen (densitet 1,62)

4.4. Farvningsreagenser

4.4.1. Jod/kaliumjodid-opløsning (2 g kaliumjodid opløses i 100 ml vand, og der tilsættes 1 g jod under hyppig omrystning)

4.4.2. Alizarin red (2,5 ml 1M saltsyre fortyndes i 100 ml vand, og der tilsættes 200 mg alizarin red til opløsningen)

4.4.3. Cystin-reagens (2 g blyacetat og 10 g NaOH i 100 ml H₂O)

4.4.4. Jod/kaliumjodid-opløsning (opløst i 70 % ethanol)

⁽¹⁾ EFT L 102 af 15.4.1976, s. 1.

4.5. Blegemiddel

4.5.1. Natriumhypochlorit-opløsning, som fås i handelen (9,6 % aktivt chlor)

5. Udstyr og hjælpemidler

5.1. Analysevægt (nøjagtighed 0,01 g undtagen for koncentreret sediment: 0,001 g)

5.2. Udstyr til findeling (mølle eller morter, specielt til foder indeholdende > 15 % fedt i analyse)

5.3. Sigte med kvadratiske masker med en maskevidde på højst 0,50 mm

5.4. Skilletragt eller bægerglas med konisk bund

5.5. Stereomikroskop (mindst 40 ' forstørrelse)

5.6. S sammensat mikroskop (mindst 400 ' forstørrelse) med lystransmission eller polariseret lys

5.7. Standard laboratorieglassudstyr

Alt udstyr rengøres omhyggeligt. Skilletragte og glassudstyr rengøres i en vaskemaskine. Sigter rengøres ved brug af en børste med stive børster.

6. Fremgangsmåde

Foder i pilleform kan sigtes på forhånd, hvis begge fraktioner analyseres som separate prøver.

En prøve på mindst 50 g skal behandles (om nødvendigt forsigtig knusning ved hjælp af passende findelingsudstyr (5.2) for at opnå en passende struktur). Det findelte materiale deles i to repræsentative dele, én på mindst 5 g til sigtefraktionering (6.1) og én på mindst 5 g til sedimentkoncentrering (6.2). Det anbefales at benytte farvning med farvningsreagenser (6.3) til identifikation.

Til angivelse af det animalske proteins art eller partiklernes oprindelse kan anvendes et beslutningsstøttesystem, som f.eks. ARIES, og referenceprøver kan dokumenteres.

6.1. Identifikation af animalske bestanddele i sigtefraktionerne

Mindst 5 g prøve deles i to fraktioner ved sigtning (5.3).

Fraktionen (fraktionerne) med store partikler (eller en repræsentativ del deraf) spredes ud i et tyndt lag på et passende underlag og screenes systematisk for animalske bestanddele under stereomikroskop ved forskellige forstørrelser (5.5).

Objektglas med fraktionen (fraktionerne) med fine partikler screenes systematisk for animalske bestanddele under sammensat mikroskop ved forskellige forstørrelser (5.6).

6.2. Identifikation af animalske bestanddele i koncentreret sediment

En prøve på mindst 5 g afvejes med en nøjagtighed på 0,01 g i en skilletragt eller et bægerglas med konisk bund og behandles med mindst 50 ml tetrachlorethylen (4.3.1). Blandingen omrystes/omrøres flere gange.

— Hvis der anvendes en lukket skilletragt, skal sedimentet henstå tilstrækkelig længe (mindst 3 minutter), før sedimentet skilles fra. Der omrystes på ny, og sedimentet henstår igen mindst 3 minutter. Sedimentet skilles igen fra.

— Anvendes der et åbent bægerglas, skal sedimentet henstå mindst 5 minutter, før sedimentet skilles fra.

Hele sedimentet tørres og vejes med en nøjagtighed på 0,001 g. Vejning er kun påkrævet, hvis der ønskes et skøn over indholdet. Hvis sedimentet består af mange store partikler, kan det deles i to fraktioner ved sigtning (5.3). Det tørrede sediment undersøges for knoglebestanddele under stereomikroskop (5.5) og sammensat mikroskop (5.6).

6.3. Brug af immersionsvæsker og farvningsreagenser

Identifikation af animalske bestanddele ved mikroskopi kan lettes ved brug af specielle immersionsvæsker og farvningsreagenser.

Chloralhydrat (4.1.1):	Ved forsigtig opvarmning ses cellestrukturene tydeligere, da stivelseskorn gelatiniserer, og uønsket celleindhold fjernes.
Lud (4.1.2):	Enten natriumhydroxid eller kaliumhydroxid renser fodermaterialet og gør det nemmere at påvise muskelfibre, hår og andre keratinholdige strukturer.
Paraffinolie og glycerol (4.1.3):	Knoglebestanddele kan tydeligt identificeres i denne immersionsvæske, da de fleste benhuler forbliver luftfyldte og fremtræder som sorte huller med en størrelse på ca. 5-15 µm.
Jod/kaliumjodid-opløsning (4.4.1):	Benyttes til påvisning af stivelse (blåviolet farve) og protein (orange gul farve). Kan eventuelt fortyndes.
Alizarin red-opløsning (4.4.2):	Rød/pink-farvning af knogler, fiskeben og skæl. Inden sedimentet tørres (se afsnit 6.2), hældes det samlede sediment i et reagensglas og skylles to gange med ca. 5 ml alkohol (4.2.1) (der anvendes vortex-apparat, opløsningsmidlet skal henstå ca. et minut, så det bundfælder sig, før det hældes fra). Inden anvendelsen af dette farvningsreagens skal sedimentet bleges ved at tilsætte mindst 1 ml natriumhypochlorit-opløsning (4.5.1). Lad reaktionen fortsætte i 10 minutter. Røret fyldes med vand, sedimentet henstår 2-3 minutter, og vandet og de suspenderede partikler hældes fra. Sedimentet renses yderligere to gange med ca. 10 ml vand (der anvendes vortex-apparat, lad henstå, og hæld hver gang vandet fra). To til ti eller flere dråber (afhængigt af restkoncentrationen) alizarin red-opløsning tilsættes. Blandingen rystes, og reaktionen skal have lov at finde sted nogle få sekunder. Det farvede sediment renses to gange med ca. 5 ml alkohol (4.2.1) efterfulgt af én skylning med acetone (4.2.2) (der anvendes vortex, opløsningsmidlet skal henstå ca. et minut, så det bundfælder sig, før det hældes fra). Sedimentet er nu klar til tørring.
Cystin-reagens(4.4.3):	Cystinholdige bestanddele (hår, fjer mv.) farves brunsorte ved forsigtig opvarmning.

6.4. Undersøgelse af foder, der eventuelt indeholder fiskemel

Mindst et objektglas fra den fine sigtefraktionen og fra sedimentets fine fraktion undersøges i sammensat mikroskop (se afsnit 6.1 og 6.2).

Hvis det af mærkningen fremgår, at ingredienserne omfatter fiskemel, eller hvis der er mistanke om tilstedeværelse af fiskemel, eller hvis der påvises fiskemel i den første undersøgelse, undersøges mindst to yderligere objektglas med den fine sigtefraktion fra den oprindelige prøve og den samlede sedimentfraktion.

7. Beregning og bedømmelse

Medlemsstaterne sørger for, at de procedurer, der er beskrevet i dette punkt, anvendes, når der foretages en officiel analyse med henblik på at foretage skøn over mængden (og ikke kun tilstedeværelsen) af animalske bestanddele.

Der kan kun foretages beregning, hvis de animalske bestanddele indeholder knoglefragmenter.

Knoglefragmenter af varmblodede landdyr (f.eks. pattedyr og fugle) kan i mikroskoppræparatet skelnes fra forskellige typer fiskeben ved hjælp af de typiske benhuler. Andelen af animalske bestanddele i prøvematerialet kan skønnes på grundlag af:

- den skønnede andel (vægtprocent) af knoglefragmenter i det koncentrerede sediment og
- knogleandelen (vægtprocent) af de animalske bestanddele.

Skønnet skal baseres på mindst tre (om muligt) præparater og mindst fem felter pr. præparat. I foderstofblandinger indeholder det koncentrerede sediment som hovedregel ikke blot knogle- og fiskebensfragmenter, men også andre partikler med høj densitet, f.eks. mineraler, sand og forveddede plantedele.

7.1. *Skønnet tal for procentdelen af knoglefragmenter*

% knoglefragmenter fra landdyr = $(S \times c)/W$

% fiskebens- og skælfragmenter = $(S \times d)/W$

(S = vægten af sediment (mg), c = korrektionsfaktor (%) for den skønnede knogleandel i sedimentet, d = korrektionsfaktor (%) for den skønnede andel af fiskebens- og skælfragmenter i sedimentet, W = vægten af prøvemateriale til sedimenteringen (mg)).

7.2. *Skønnet værdi for animalske bestanddele*

Andelen af knogler i animalske produkter kan variere betragteligt. (I benmel er knogle-/benandelen ca. 50-60 %, og i kødmel ca. 20-30 %; i fiskemel varierer indholdet af ben og skæl med melets kategori og oprindelse, men er normalt ca. 10-20 %).

Hvis det vides, hvilken type dyremel der er til stede i prøven, kan indholdet deraf skønnes således:

Skønnet indhold af bestanddele af landdyrprodukter (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Skønnet indhold af bestanddele af fiskeprodukter (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

(S = vægten af sediment (mg), c = korrektionsfaktor (%) for den skønnede knogleandel i sedimentet, d = korrektionsfaktor (%) for den skønnede andel af fiskebens- og skælfragmenter i sedimentet, f = korrektionsfaktor for knogle/benandelen af de animalske bestanddele i den undersøgte prøve, W = vægten af prøvemateriale til sedimenteringen (mg)).

8. **Angivelse af undersøgelsens resultat**

Rapporten skal mindst indeholde oplysninger om tilstedeværelsen af bestanddele fra landdyr og fra fiskemel. De forskellige tilfælde afrapporteres på følgende måde:

8.1. *For så vidt angår tilstedeværelse af bestanddele fra landdyr:*

- Der har ved mikroskopi ikke kunnet iagttages bestanddele fra landdyr i den forelagte prøve eller
- der har ved mikroskopi kunnet iagttages bestanddele fra landdyr i den forelagte prøve

8.2. *For så vidt angår fiskemel:*

- Der har ved mikroskopi ikke kunnet iagttages bestanddele fra fisk i den forelagte prøve eller:
- der har ved mikroskopi kunnet iagttages bestanddele fra fisk i den forelagte prøve.

Hvis der findes bestanddele fra fisk eller landdyr, kan rapporten over undersøgelsens resultater eventuelt yderligere anføre et skøn over indholdet af påviste bestanddele (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % eller > 5 %), eventuelt yderligere specificering af typen af landdyr og identificerede animalske bestanddele (muskelfibre, brusk, knogler, horn, hår, børster, fjer, blod, æggeskaller, fiskeben og skæl).

Hvis der foretages et skøn over indholdet af animalske ingredienser, anføres den anvendte korrektionsfaktor f.

Hvis der er påvist knoglebestanddele fra landdyr, skal der i rapporten anføres følgende:

»Det kan ikke udelukkes, at ovennævnte bestanddele hidrører fra pattedyr.«

Dette er ikke nødvendigt, hvis knoglefragmenterne fra landdyr er blevet specificeret som fragmenter fra fjerkræ eller pattedyr.

9. **Fakultativ protokol for analyse af fedt eller olie**

Følgende protokol kan anvendes ved analyse af fedt eller olie:

- Fedt i fast form opvarmes f.eks. i en mikrobølgeovn, indtil det bliver flydende
 - Ved hjælp af en pipette overføres 40 ml fedt fra bunden af prøven til et centrifugerør
 - Der centrifugeres ved 4 000 rpm i 10 minutter
 - Hvis fedtet efter centrifugering er fast, opvarmes det på ny i en mikrobølgeovn, indtil det bliver flydende. Der centrifugeres endnu en gang ved 4 000 rpm i 5 minutter
 - Halvdelen af de dekanterede urenheder overføres med en lille ske eller spatel til en lille petriskål eller et objektglas med henblik på identificering af eventuelt indhold af animalske bestanddele ved mikroskopi (kødfibre, fjer, knoglefragmenter ...). Det anbefales at bruge paraffinolie eller glycerol som immersionsvæske
 - De resterende urenheder anvendes til sedimentering som beskrevet i punkt 6.2.
-