

ΟΔΗΓΙΑ 2003/126/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 23ης Δεκεμβρίου 2003

για καθορισμό αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 70/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 20ής Ιουλίου 1970, περί εισαγωγής τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων κοινοτικής αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Σύμφωνα με την οδηγία 70/373/ΕΟΚ οι επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών με σκοπό τη διαπίστωση της τήρησης των αναφερομένων όρων στις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που αφορούν την ποιότητα και τη σύνθεση των ζωοτροφών πρέπει να διενεργούνται σύμφωνα με τις κοινοτικές μεθόδους λήψης δειγμάτων και ανάλυσης.
- (2) Οι διατάξεις σχετικά με την επισημάνση των ζωοτροφών και οι απαιτήσεις απαγόρευσης της χρήσης ορισμένων ειδών ζωικών πρωτεϊνών στις ζωοτροφές υποδεικνύουν την ανάγκη θέσπισης αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της παρουσίας τους και, κατά περίπτωση, του ποσοστού τους.
- (3) Η μέθοδος που περιγράφεται στην οδηγία 98/88/ΕΚ της Επιτροπής, της 13ης Νοεμβρίου 1998, για τον καθορισμό κατευθυντήριων γραμμών για τη μικροσκοπική ταυτοποίηση και για τον κατ' εκτίμηση προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών⁽²⁾ είναι σήμερα η μόνη επικυρωμένη μέθοδος για τον έλεγχο της παρουσίας ζωικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί επεξεργασία σε 133 °C και πίεση 3 bar επί 20 λεπτά, στις ζωοτροφές.
- (4) Μια συγκριτική μελέτη για τον προσδιορισμό μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών απέδειξε προσφάτως ότι οι διαφορές στην εκτέλεση των μικροσκοπικών δοκιμών που ορίζονται στην οδηγία 98/88/ΕΚ οδήγησαν σε σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ευαισθησία, την ειδικότητα και την ακρίβεια της μεθόδου. Προκειμένου να εναρμονιστεί και να βελτιωθεί ο προσδιορισμός μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών, θα πρέπει να γίνουν πιο συγκεκριμένες και υποχρεωτικές οι διατάξεις που αφορούν τη μικροσκοπική μέθοδο. Είναι αναγκαίο να εξασφαλιστεί ότι οι αναλυτές που εφαρμόζουν τη μέθοδο θα είναι επαρκώς εκπαιδευμένοι, δεδομένου ότι η απόδοση εξαρτάται από τις ικανότητες του αναλυτή.
- (5) Συνεπώς, η οδηγία 98/99/ΕΚ πρέπει να αντικατασταθεί.

- (6) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι όταν πραγματοποιείται επίσημη ανάλυση ζωοτροφών με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας, την ταυτοποίηση ή/και τον κατ' εκτίμηση προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές, στο πλαίσιο του προγράμματος συντονισμένων επιθεωρήσεων στον τομέα της διατροφής των ζώων, σύμφωνα με την οδηγία 95/53/ΕΚ του Συμβουλίου⁽³⁾, αυτή θα πραγματοποιείται σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος της παρούσας οδηγίας.

Άρθρο 2

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι τα εργαστήρια που πραγματοποιούν τους επίσημους ελέγχους για την παρουσία συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές συμμετέχουν περιοδικά σε δοκιμές επάρκειας όσον αφορά τις αναλυτικές μεθόδους και ότι το προσωπικό των εργαστηρίων που πραγματοποιούν αναλύσεις δέχεται επαρκή κατάρτιση.

Άρθρο 3

Η οδηγία 98/88/ΕΚ καταργείται.

Οι αναφορές στην καταργούμενη οδηγία θα θεωρούνται αναφορές στην παρούσα οδηγία.

Άρθρο 4

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις αναγκαίες νομοθετικές, κανονιστικές ή διοικητικές διατάξεις για να συμμορφωθούν με την παρούσα οδηγία έως την 1η Ιουλίου 2004 το αργότερο. Ανακοινώνουν αμέσως στην Επιτροπή το κείμενο των διατάξεων αυτών και πίνακα αντιστοιχίας μεταξύ των εν λόγω διατάξεων και της παρούσας οδηγίας.

Οι διατάξεις αυτές, όταν θεσπίζονται από τα κράτη μέλη, αναφέρονται στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από παρόμοια αναφορά κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Οι λεπτομερείς διατάξεις για την αναφορά αυτή καθορίζονται από τα κράτη μέλη.

2. Τα κράτη μέλη ανακοινώνουν στην Επιτροπή τα κείμενα των διατάξεων της εθνικής νομοθεσίας που θεσπίζουν στον τομέα που καλύπτεται από την παρούσα οδηγία.

⁽¹⁾ ΕΕ L 170 της 3.8.1970, σ. 2· οδηγία όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 807/2003 (ΕΕ L 122 της 16.5.2003, σ. 36).

⁽²⁾ ΕΕ L 318 της 27.11.1998, σ. 45.

⁽³⁾ ΕΕ L 265 της 5.11.1995, σ. 17· οδηγία όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 2001/46/ΕΚ (ΕΕ L 234 της 1.9.2001, σ. 55).

Άρθρο 5

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Άρθρο 6

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 23 Δεκεμβρίου 2003.

Για την Επιτροπή
David BYRNE
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Όροι για τη μικροσκοπική ανίχνευση, την ταυτοποίηση ή τον καθ' εκτίμηση προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές**1. Στόχος και πεδίο εφαρμογής**

Οι όροι αυτοί πρέπει να εφαρμόζονται όταν η ανίχνευση συστατικών ζωικής προέλευσης (τα οποία ορίζονται ως προϊόντα της μεταποίησης σφαγίων ή τμημάτων σφαγίων θηλαστικών, πουλερικών ή ψαριών) στις ζωοτροφές πραγματοποιείται με μικροσκοπική εξέταση στο πλαίσιο του προγράμματος συντονισμένων επιθεωρήσεων στον τομέα της διατροφής των ζώων σύμφωνα με την οδηγία 95/53/ΕΚ του Συμβουλίου. Με την προϋπόθεση ότι οι μέθοδοι του παρόντος παραρτήματος θα χρησιμοποιούνται σε όλες τις επίσημες δοκιμές, μπορεί επίσης να πραγματοποιείται και μια δεύτερη δοκιμή με τη χρήση παραλλαγμένων ή εναλλακτικών μεθόδων προκειμένου να βελτιώνεται η ανίχνευση ορισμένων ειδών συστατικών ζωικής προέλευσης ή να διευκρινίζεται καλύτερα η προέλευση των εν λόγω συστατικών. Επιπλέον, όταν εξετάζονται ορισμένα ειδικά συστατικά ζωικής προέλευσης όπως το πλάσμα ή οστά σε λίπος μπορεί να χρησιμοποιείται ένα παραλλαγμένο πρωτόκολλο (βλέπε επίσης σημείο 9), με την προϋπόθεση ότι οι αναλύσεις αυτές θα πραγματοποιούνται επιπροσθέτως προς τις αναλύσεις που προβλέπονται στο πρόγραμμα συντονισμένων επιθεωρήσεων.

2. Ευαισθησία

Σε συνάρτηση με τη φύση των συστατικών ζωικής προέλευσης, είναι εφικτή η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων τους (< 0,1 %) στις ζωοτροφές.

3. Αρχή της μεθόδου

Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιείται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, το οποίο έχει ληφθεί σύμφωνα με τα προβλεπόμενα στην οδηγία 76/371/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 1ης Μαρτίου 1976, περί καθορισμού κοινοτικών τρόπων δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών⁽¹⁾, και το οποίο έχει προετοιμαστεί καταλλήλως. Το ακόλουθο πρωτόκολλο είναι κατάλληλο για τις ζωοτροφές με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Οι τροφές με υγρασία μεγαλύτερη από 14 % πρέπει να ξηραίνονται (να συμπυκνώνονται) πριν χρησιμοποιηθούν. Ορισμένες ειδικές ζωοτροφές ή υλικά ζωοτροφών (π.χ. λίπη, έλαια) απαιτούν ιδιαίτερη επεξεργασία (βλέπε σημείο 9). Τα συστατικά ζωικής προέλευσης ταυτοποιούνται με βάση τυπικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι ταυτοποιήσιμα με χρήση μικροσκοπίου (δηλαδή: μυϊκές ίνες και άλλα σωματίδια κρέατος, χόνδροι, οστά, κέρατα, τρίχες, χνούδι, αίμα, πτερά, κελύφη αυγών, ψαροκόκαλα, λέπια). Η ταυτοποίηση πρέπει να πραγματοποιείται τόσο στο κοσκινισμένο τμήμα (6.1) όσο και στο συμπυκνωμένο ίζημα (6.2) του δείγματος.

4. Αντιδραστήρια**4.1. Παράγοντας ενσωμάτωσης**

4.1.1. Ένυδρη χλωράλη (υδατικό διάλυμα, 60 % w/v)

4.1.2. Αλισίβα (NaOH 2,5 % w/v ή KOH 2,5 % w/v) για τα κοσκινισμένα τμήματα

4.1.3. Παραφινέλαιο ή γλυκερόλη (ιξώδες: 68-81) για μικροσκοπικές παρατηρήσεις στο ίζημα

4.2. Παράγοντες έκπλυσης

4.2.1. Αλκοόλη, 96 %

4.2.2. Ακετόνη

4.3. Παράγοντας συμπύκνωσης

4.3.1. Τετραχλωραιθυλένιο (πυκνότητα 1,62)

4.4. Αντιδραστήρια χρώσης

4.4.1. Διάλυμα ιωδίου/ιωδιούχου καλίου (διαλύονται 2 g ιωδιούχου καλίου σε 100 ml νερού και προστίθεται 1 g ιωδίου με συχνή ανακίνηση)

4.4.2. Ερυθρό της αλιζαρίνης (αραιώνονται 2,5 ml υδροχλωρικού οξέος 1M σε 100 ml νερού και στο διάλυμα προστίθενται 200 mg ερυθρού της αλιζαρίνης)

4.4.3. Αντιδραστήριο κυστίνης (2 g οξικού μολύβδου, 10 g NaOH/100 ml H₂O)

4.4.4. Διάλυμα ιωδίου/ιωδιούχου καλίου (σε διάλυμα αιθανόλης 70 %)

⁽¹⁾ ΕΕ L 102 της 15.4.1976, σ. 1.

- 4.5. Αντιδραστήριο λεύκανσης
4.5.1. Εμπορικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (9,6 % ενεργό χλώριο)

5. Εξοπλισμός και εξαρτήματα

- 5.1. Αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια 0,01 g εκτός από το συμπυκνωμένο ίζημα: 0,001 g)
5.2. Υλικό άλεσης (μύλος άλεσης ή γουδί ειδικά για ζωοτροφές που περιέχουν > 15 % λίπος σε ανάλυση)
5.3. Κόσκινο με τετράγωνα διάκενα των οποίων το άνοιγμα είναι 0,50 mm το πολύ
5.4. Διαχωριστική χοάνη ή ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα
5.5. Διόφθαλμο μικροσκόπιο (μεγέθυνση τουλάχιστον 40 φορές)
5.6. Απλό μικροσκόπιο (μεγέθυνση τουλάχιστον 400 φορές), εκπεπομένου ή πολωμένου φωτός
5.7. Συνήθη γυάλινα εργαστηριακά σκεύη

Όλος ο εξοπλισμός πρέπει να καθαρίζεται εξονυχιστικά. Οι διαχωριστικές χοάνες και τα γυάλινα σκεύη πρέπει να πλένονται σε πλυντήριο. Τα κόσκινα πρέπει να καθαρίζονται με βούρτσα με σκληρές τρίχες.

6. Procedure

Οι ζωοτροφές υπό μορφή σφαιριδίων πρέπει να προκοσκινίζονται εάν και τα δύο τμήματα αναλύονται ως ξεχωριστό δείγμα.

Υποβάλλονται σε επεξεργασία τουλάχιστον 50 g του δείγματος (προσεκτική άλεση με τη χρήση του κατάλληλου εξοπλισμού άλεσης (5.2), εφόσον παρίσταται ανάγκη, προκειμένου να επιτευχθεί κατάλληλη δομή). Από το αλεσμένο υλικό λαμβάνονται κατόπιν δύο αντιπροσωπευτικά μέρη, ένα (τουλάχιστον 5 g) για το κοσκινισμένο μέρος (6.1) και ένα (τουλάχιστον 5 g) για το συμπυκνωμένο ίζημα (6.2). Ο χρωματισμός με αντιδραστήρια χρώσης (6.3) μπορεί επιπροσθέτως να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η φύση των ζωικών πρωτεϊνών και η προέλευση των σωματιδίων, μπορεί να χρησιμοποιείται ένα σύστημα για την υποστήριξη της λήψης απόφασης, όπως το ARIES, καθώς να γίνεται τεκμηρίωση των δειγμάτων αναφοράς.

6.1. Ταυτοποίηση των συστατικών ζωικής προέλευσης στα κοσκινισμένα τμήματα

Τουλάχιστον 5 g του δείγματος κοσκινίζονται (5.3) σε δύο τμήματα

Το(-α) κοσκινισμένο(-α) τμήμα(-τα) με τα μεγάλα σωματίδια (ή ένα αντιπροσωπευτικό μέρος του τμήματος) απλώνεται σε ένα κατάλληλο υπόστρωμα ούτως ώστε να σχηματιστεί ένα λεπτό στρώμα και αποτελεί αντικείμενο συστηματικής παρατήρησης με διόφθαλμο μικροσκόπιο (5.5) σε διάφορες μεγεθύνσεις για να ανιχνευθούν τα συστατικά ζωικής προέλευσης.

Προετοιμάζονται πλάκες με το(-α) κοσκινισμένο(-α) τμήμα(-τα) με τα μικρά σωματίδια, οι οποίες αποτελούν αντικείμενο συστηματικής παρατήρησης με χρήση απλού μικροσκοπίου (5.6) σε διάφορες μεγεθύνσεις για την ανίχνευση των συστατικών ζωικής προέλευσης.

6.2. Ταυτοποίηση των συστατικών ζωικής προέλευσης στο συμπυκνωμένο ίζημα

Τουλάχιστον 5 g (ακρίβεια 0,01 g) του δείγματος μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη ή σε ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα και υποβάλλονται σε επεξεργασία με 50 ml τουλάχιστον τετραχλωροαιθυλενίου (4.3.1). Το μείγμα υποβάλλεται σε επανειλημμένη ανακίνηση/ανάδευση.

— Αν χρησιμοποιείται κλειστή διαχωριστική χοάνη, το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία επί επαρκές χρονικό διάστημα (τουλάχιστον τρία λεπτά) πριν διαχωριστεί το ίζημα. Η ανακίνηση επαναλαμβάνεται και το μείγμα αφήνεται και πάλι σε ηρεμία για τουλάχιστον τρία λεπτά. Το ίζημα διαχωρίζεται ξανά.

— Αν χρησιμοποιείται ανοικτό ποτήρι ζέσεως, το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον πέντε λεπτά πριν διαχωριστεί το ίζημα.

Το συνολικό ίζημα ξηραίνεται και κατόπιν ζυγίζεται (ακρίβεια 0,001 g). Η ζύγιση είναι απαραίτητη μόνον εφόσον απαιτείται εκτίμηση. Αν το ίζημα αποτελείται από πολλά μεγάλα σωματίδια, μπορεί να κοσκινιστεί (5.3) σε δύο τμήματα. Το αποξηραμένο ίζημα εξετάζεται με διόφθαλμο μικροσκόπιο (5.5) και με απλό μικροσκόπιο (5.6) για να διαπιστωθεί η ύπαρξη συστατικών οστών.

6.3. Χρήση παραγόντων ενσωμάτωσης και αντιδραστηρίων χρώσης

Η μικροσκοπική ταυτοποίηση των συστατικών ζωικής προέλευσης μπορεί να διευκολυνθεί με τη χρήση ειδικών παραγόντων ενσωμάτωσης και αντιδραστηρίων χρώσης.

- Ένυδρη χλωράλη (4.1.1): Με προσεκτική θέρμανση, οι κυτταρικές δομές γίνονται πιο ευδιάκριτες διότι οι κόκκοι του αμύλου ζελατινοποιούνται και απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα κυτταρικά συστατικά.
- Αλισίβα (4.1.2): το υδροξείδιο του νατρίου ή το υδροξείδιο του καλίου καθαρίζει το υλικό της ζωτροφής, βοηθώντας την ανίχνευση μυϊκών ινών, τριχών και άλλων δομών κερατινής.
- Παραφινέλαιο και γλυκερόλη (4.1.3): Τα συστατικά οστών μπορούν να ταυτοποιηθούν με αυτόν τον παράγοντα ενσωμάτωσης επειδή τα περισσότερα κενά παραμένουν γεμάτα με αέρα και εμφανίζονται ως μαύρες σπές μεγέθους 5-15 μm.
- Διάλυμα ιωδίου/ιωδιούχου καλίου (4.4.1): Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αμύλου (χαρακτηριστική κυανή-ιώδης απόχρωση) και πρωτεϊνών (χρώμα κίτρινο-πορτοκαλί). Εφόσον χρειάζεται, τα διαλύματα μπορούν να αραιώνονται.
- Διάλυμα ερυθρού της αλιζαρίνης (4.4.2): Ερυθρά/ροδόχρους απόχρωση οστών, ψαροκόκαλων και λεπιών. Πριν από την ξήρανση του ιζήματος (βλέπε τμήμα 6.2), το συνολικό ίζημα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και πλένεται δύο φορές με 5 ml περίπου αλκοόλης (4.2.1) (κάθε φορά χρησιμοποιείται αναδευτήρας περιδίνησης, ο διαλύτης αφήνεται περίπου ένα λεπτό σε ηρεμία και κατόπιν χύνεται). Πριν χρησιμοποιηθεί αυτό το αντιδραστήριο χρώσης, το ίζημα πρέπει να λευκαίνεται με την προσθήκη τουλάχιστον 1 ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου (4.5.1). Η αντίδραση αφήνεται να συνεχιστεί για 10 λεπτά. Ο δοκιμαστικός σωλήνας πληρούται με νερό, το ίζημα αφήνεται 2 με 3 λεπτά να κατακρημνιστεί και κατόπιν το νερό και τα αιωρούμενα σωματίδια χύνονται. Το ίζημα πλένεται ακόμη δύο φορές με περίπου 10 ml νερού (χρησιμοποιείται αναδευτήρας περιδίνησης, αφήνεται σε ηρεμία και χύνεται το νερό κάθε φορά). Προστίθενται 2-10 ή περισσότερες σταγόνες (ανάλογα με το ποσό του υπολείμματος) διαλύματος ερυθρού της αλιζαρίνης. Το μείγμα ανακινείται και αφήνεται μερικά δευτερόλεπτα να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Το χρωματισμένο ίζημα πλένεται δύο φορές με περίπου 5 ml αλκοόλης (4.2.1) και κατόπιν μία φορά με ακετόνη (4.2.2) (κάθε φορά χρησιμοποιείται αναδευτήρας περιδίνησης, ο διαλύτης αφήνεται περίπου ένα λεπτό σε ηρεμία και κατόπιν χύνεται). Το ίζημα είναι πλέον έτοιμο για ξήρανση.
- Αντιδραστήριο κυστίνης (4.4.3): Με προσεκτική θέρμανση τα συστατικά που περιέχουν κυστίνη (τριχές, φτερά κ.λπ.) παίρνουν μαύρο-καφέ χρώμα.

6.4. Εξέταση ζωτροφών που πιθανόν περιέχουν ιχθυάλευρο

Τουλάχιστον μία πλάκα πρέπει να εξετάζεται από το λεπτοκοκκινισμένο μέρος και από το λεπτό τμήμα του ιζήματος με απλό μικροσκόπιο (βλέπε τμήματα 6.1 και 6.2).

Όταν η ετικέτα αναγράφει ότι τα συστατικά περιλαμβάνουν ιχθυάλευρο ή αν υπάρχει υποψία παρουσίας ιχθυάλευρου ή αν αυτό έχει ανιχνευθεί στην αρχική εξέταση, πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο ακόμη πλάκες του ψιλοκοκκινισμένου τμήματος από το αρχικό δείγμα καθώς και ολόκληρο το ίζημα.

7. Υπολογισμός και εκτίμηση

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι όταν πραγματοποιείται επίσημη ανάλυση προκειμένου να εκτιμηθεί η ποσότητα (και όχι απλώς η παρουσία) των συστατικών ζωικής προέλευσης ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν σημείο.

Ο υπολογισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε περίπτωση που τα συστατικά ζωικής προέλευσης περιλαμβάνουν θραύσματα οστών.

Τα θραύσματα οστών χερσαίων θερμόαιμων ζωικών ειδών (όπως θηλαστικά και πτηνά) μπορούν να διακριθούν από τα διάφορα είδη ψαροκόκαλων στη μικροσκοπική πλάκα χάρη στα χαρακτηριστικά τους κενά. Η αναλογία συστατικών ζωικής προέλευσης στο δείγμα του υλικού εκτιμάται λαμβάνοντας υπόψη:

- την εκτιμώμενη αναλογία (βάρος %) υπολειμμάτων οστών στο συμπυκνωμένο ίζημα και
- την αναλογία (βάρος %) οστών στα συστατικά ζωικής προέλευσης.

Η εκτίμηση πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον τρεις (εφόσον αυτό είναι εφικτό) πλάκες και τουλάχιστον πέντε οπτικά πεδία για κάθε πλάκα. Στην περίπτωση μειγμάτων ζωτροφών, το συμπυκνωμένο ίζημα περιλαμβάνει, κατά κανόνα, όχι μόνο θραύσματα οστών ζώων της ξηράς και ψαροκόκαλων, αλλά και άλλα σωματίδια υψηλού ειδικού βάρους, όπως: ανόργανες ουσίες, άμμος, θραύσματα ξυλωδών νερών φυτών κ.λπ.

7.1. Κατ' εκτίμηση προσδιορισμός του ποσοστού θραυσμάτων οστών

$$\% \text{ θραυσμάτων οστών ζώων της ξηράς} = (S \times c)/W$$

$$\% \text{ θραυσμάτων ψαροκόκαλων και λεπιών} = (S \times d)/W$$

[S = βάρος ιζήματος (mg), c = διορθωτικός συντελεστής (%) για τον κατ' εκτίμηση προσδιορισμό της αναλογίας οστών ζώων της ξηράς στο ίζημα, d = διορθωτικός συντελεστής (%) για τον κατ' εκτίμηση προσδιορισμό της αναλογίας θραυσμάτων ψαροκόκαλων και λεπιών στο ίζημα, W = βάρος του υλικού του δείγματος για την καθίζηση (mg)].

7.2. Κατ' εκτίμηση προσδιορισμός του ποσοστού συστατικών ζωικής προέλευσης

Η αναλογία οστών στα ζωικά προϊόντα μπορεί να κυμαίνεται σε μεγάλο βαθμό. (Το ποσοστό οστών στην περίπτωση οστεαλεύρων είναι της τάξεως του 50-60 % και στην περίπτωση κρεαταλεύρων της τάξεως του 20-30 %· σε περίπτωση ιχθυαλεύρων, η αναλογία των τμημάτων ψαροκόκαλων και λεπιών κυμαίνεται ανάλογα με την κατηγορία και την καταγωγή του ιχθυάλευρου: συνήθως είναι της τάξεως του 10-20 %).

Σε περίπτωση που είναι γνωστό το είδος του ζωικού αλεύρου που υπάρχει στο δείγμα, είναι εφικτός ο κατ' εκτίμηση προσδιορισμός της περιεκτικότητας:

$$\text{Κατ' εκτίμηση περιεκτικότητα σε συστατικά προϊόντων ζώων της ξηράς (\%)} = (S \times c)/(W \times f) \times 100$$

$$\text{Κατ' εκτίμηση περιεκτικότητα σε συστατικά προϊόντων ψαριών (\%)} = (S \times d)/(W \times f) \times 100$$

[S = βάρος ιζήματος (mg), c = διορθωτικός συντελεστής (%) για τον κατ' εκτίμηση προσδιορισμό της αναλογίας οστών ζώων της ξηράς στο ίζημα, d = διορθωτικός συντελεστής (%) για τον κατ' εκτίμηση προσδιορισμό της αναλογίας θραυσμάτων ψαροκόκαλων και λεπιών στο ίζημα, f = διορθωτικός συντελεστής για την αναλογία οστών στα συστατικά ζωικής προέλευσης του υπό εξέταση δείγματος, W = βάρος του υλικού του δείγματος για την καθίζηση (mg)].

8. Παρουσίαση των πορισμάτων της εξέτασης

Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον πληροφορίες σχετικά με την παρουσία συστατικών που προέρχονται από ζώα της ξηράς και από ιχθυάλευρα. Οι διάφορες περιπτώσεις θα πρέπει να αναφέρονται με τον ακόλουθο τρόπο:

8.1. Όσον αφορά την παρουσία συστατικών που προέρχονται από ζώα της ξηράς:

— στο βαθμό που ήταν διακριτό με μικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν διαπιστώθηκε κανένα συστατικό που να προέρχεται από ζώα της ξηράς,

ή:

— στο βαθμό που ήταν διακριτό με μικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε διαπιστώθηκε η παρουσία συστατικών που προέρχονται από ζώα της ξηράς:

8.2. και όσον αφορά την παρουσία ιχθυαλεύρου:

— στο βαθμό που ήταν διακριτό με μικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν διαπιστώθηκε κανένα συστατικό που να προέρχεται από ιχθυάλευρο,

ή:

— στο βαθμό που ήταν διακριτό με μικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε διαπιστώθηκε η παρουσία συστατικών που προέρχονται από ιχθυάλευρο.

Σε περίπτωση που διαπιστώθηκε η παρουσία συστατικών που προέρχονται από ιχθυάλευρο ή από ζώα της ξηράς, το πόρισμα της εξέτασης μπορεί, εφόσον απαιτείται, να αναφέρει και εκτίμηση του ποσού των συστατικών που ανιχνεύθηκαν (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % ή > 5 %), να διευκρινίζει το είδος του ζώου της ξηράς, εάν είναι δυνατόν, καθώς και τα συστατικά ζωικής προέλευσης που εντοπίστηκαν (μυϊκές ίνες, χόνδροι, οστά, κέρατα, τρίχες, χνούδι, πτερά, αίμα, κελύφη αυγών, ψαροκόκαλα, λέπια).

Για τις περιπτώσεις που γίνεται εκτίμηση των ποσοτήτων των συστατικών ζωικής προέλευσης, πρέπει να αναφέρεται ο χρησιμοποιούμενος διορθωτικός συντελεστής f.

Για τις περιπτώσεις που ταυτοποιούνται συστατικά οστών από ζώα της ξηράς, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει την ακόλουθη επιπρόσθετη φράση:

«Δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο τα ως άνω συστατικά να προέρχονται από θηλαστικά.»

Η πρόσθετη αυτή φράση αυτή δεν είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις θραυσμάτων οστών ζώων της ξηράς, όταν έχει διευκρινιστεί ότι πρόκειται για θραύσματα οστών πουλερικών ή θηλαστικών.

9. **Προαιρετικό πρωτόκολλο για την ανάλυση λιπών ή ελαίων**

Το ακόλουθο πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιείται για την ανάλυση των λιπών ή ελαίων:

- Αν το λίπος είναι στερεό, θερμαίνεται π.χ. σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου υγροποιηθεί.
 - Με τη χρήση σιφωνίου, μεταφέρονται 40 ml λίπους από τον πυθμένα του δείγματος σε σωλήνα φυγοκέντρησης.
 - Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση επί 10 λεπτά σε 4 000 rpm.
 - Αν το λίπος είναι στερεό μετά τη φυγοκέντρηση, θερμαίνεται ακόμη μια φορά σε φούρνο μέχρις ότου υγροποιηθεί. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση επί 5 λεπτά σε 4 000 rpm.
 - Χρησιμοποιώντας ένα μικρό κουτάλι ή μια σπάτουλα, το ήμισυ των προσμείξεων του υπερκείμενου του ιζήματος διαλύματος μεταφέρεται σε ένα μικρό τρυβλίο Petri ή σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα για μικροσκοπική ταυτοποίηση πιθανού περιεχομένου συστατικών ζωικής προέλευσης (ίνες κρέατος, πτερά, θραύσματα οστών κ.λπ.). Ως παράγοντας ενσωμάτωσης για τη μικροσκοπική εξέταση συνιστάται να χρησιμοποιείται παραφινέλαιο ή γλυκερόλη.
 - Οι προσμείξεις που εναπομένουν χρησιμοποιούνται για ιζηματοποίηση, όπως περιγράφεται στο σημείο 6.2.
-