

**KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr 51/2013,****16. jaanuar 2013,****millega muudetakse määrust (EÜ) nr 152/2009 seoses analüüsimeetoditega loomse päritoluga osakeste määramiseks sööda ametlikul kontrollimisel****(EMPs kohaldatav tekst)**

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta määrust (EÜ) nr 882/2004 ametlike kontrollide kohta, mida tehakse sööda- ja toidulaste õigusnormide ning loomateravishoidu ja loomade heaolu käsitlevate eeskirjade täitmise kontrollimise tagamiseks, <sup>(1)</sup> eriti selle artikli 11 lõiget 4,

ning arvestades järgmist:

- (1) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. mai 2001. aasta määruse (EÜ) nr 999/2001 (millega sätestatakse teatavate transmissiivsete spongioossete entsefalopaatiate vältimise, kontrolli ja likvideerimise eeskirjad) <sup>(2)</sup> artikli 7 lõikes 1 on sätestatud, et loomadelt saadud valkude söötmine mäletsejalistele on keelatud. Kooskõlas kõnealuse määruse IV lisaga laiendatakse seda keeldu muudele loomadele kui mäletsejalistele ning piiratakse nende loomade söötmist loomsete saadustega.
- (2) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 21. oktoobri 2009. aasta määruse (EÜ) nr 1069/2009 (milles sätestatakse muuks otstarbeks kui inimtoiduks ettenähtud loomsete kõrvalsaaduste ja nendest saadud toodete tervise-eeskirjad ning tunnistatakse kehtetuks määrus (EÜ) nr 1774/2002) <sup>(3)</sup> artikli 11 lõikega 1 on keelatud teatavat liiki maismaaloomade, välja arvatud karusloomade söötmine töödeldud loomse valguga, mis on saadud sama liigi loomade kehast või kehaosadest, ning samuti tehistingimustes peetavate kalade söötmine töödeldud loomse valguga, mis on saadud sama liiki tehistingimustes peetavate kalade kehast või kehaosadest.
- (3) Komisjoni 27. jaanuari 2009. aasta määruse (EÜ) nr 152/2009 (milles sätestatakse proovivõtu- ja analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrolliks) <sup>(4)</sup> VI lisas on

esitatud analüüsimeetodid loomse päritoluga komponentide määramiseks sööda ametlikul kontrollimisel. Mikroskoopilise meetodiga, mis praegu on ainus valideeritud meetod loomsete valkude tuvastamiseks söödas, on võimalik eristada maismaaloomadest saadud osakeste esinemist kalast saadud osakeste esinemisest, aga selle meetodi abil ei ole võimalik kvantitatiivselt määrata piisava täpsusega söödas esinevate loomsete osakeste hulka ja seetõttu ei tohiks kõnealust meetodit selleks eesmärgiks kasutada.

- (4) ELi referentlabor valideeris sööda loomsete osakeste määramise uue meetodi, mis põhineb loomsete valkude tuvastamisel polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil. Liikmesriikide referentlaborite poolt korraldatud rakendus-uuring tõendas, et uus meetod on piisavalt kindel, et seda kasutada liidu ametliku kontrolli meetodina. Uue meetodi abil on võimalik tuvastada loomsete osakeste esinemist söödas ja samuti teha kindlaks nende osakeste liigipäritolu. Uue meetodi kasutamine koos mikroskoopilise meetodiga või selle asemel (vastavalt vajadusele) on väga otstarbekas määrustes (EÜ) nr 999/2001 ja (EÜ) nr 1069/2009 sätestatud sööda-keeldude nõuetekohase rakendamise kontrolliks.
- (5) Seetõttu tuleks määruse (EÜ) nr 152/2009 VI lisa asendada.
- (6) Käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas toiduahela ja loomatervishoiu alalise komitee arvamusega ning ei Euroopa Parlament ega nõukogu ole vastuväiteid esitanud,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

*Artikkel 1*

Määruse (EÜ) nr 152/2009 VI lisa asendatakse käesoleva määruse lisa tekstiga.

<sup>(1)</sup> ELT L 165, 30.4.2004, lk 1.

<sup>(2)</sup> EÜT L 147, 31.5.2001, lk 1.

<sup>(3)</sup> ELT L 300, 14.11.2009, lk 1.

<sup>(4)</sup> ELT L 54, 26.2.2009, lk 1.

*Artikkel 2*

Käesolev määrus jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 16. jaanuar 2013

*Komisjoni nimel*  
*president*  
José Manuel BARROSO

---

## LISA

## „VI LISA

**ANALÜÜSIMETODID LOOMSE PÄRITOLUGA OSAKESTE MÄÄRAMISEKS SÖÖDA AMETLIKUL KONTROLLIMISEL****1. EESMÄRK JA REGULEERIMISALA**

Loomse päritoluga komponendid söödas määratakse valgusmikroskoopia või polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil vastavalt käesolevas lisas esitatud sätetele.

Nende kahe meetodi abil on võimalik tuvastada loomse päritoluga osakeste esinemist söödamaterjalides ja segajõusöödas. Nende meetodite abil ei ole siiski võimalik arvutada selliste osakeste hulka söödamaterjalides või segajõusöödas. Mõlema meetodi avastamispiir on alla 0,1 massiprotsendi.

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodi abil on võimalik tuvastada, millisesse taksonoomilisse rühma kuuluvad söödamaterjalides ja segajõusöödas esinevad loomse päritoluga osakesed.

Neid meetodeid kasutatakse määruse (EÜ) nr 999/2001 artikli 7 lõikes 1 ja IV lisas ning määruse (EÜ) nr 1069/2009 artikli 11 lõikes 1 sätestatud keeldude kohaldamise kontrolliks.

Sõltuvalt kontrollitava sööda liigist võib neid meetodeid kasutada ühe katse-eeskirja raames kas eraldi või koos vastavalt ELi referentlabori poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale söödas leiduvate loomsete valkude määramiseks (EURL-AP) <sup>(1)</sup>.

**2. MEETODID****2.1. Valgusmikroskoopia****2.1.1. Põhimõte**

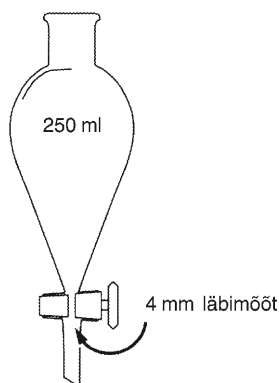
Loomse päritoluga osakesed, mis võivad esineda analüüsimiseks saadetud söödamaterjalides ja segajõusöödas, tehakse kindlaks tüüpiliste mikroskoobiga nähtavate tunnuste alusel (nt lihaskiud ja muud lihaosakesed, kõhr, luu- või sarveosakesed, karvad, harjased, veri, suled, munakoored, kalaluud, soomused).

**2.1.2. Reaktiivid ja seadmed****2.1.2.1. Reaktiivid****2.1.2.1.1. Kontsentreeriv aine****2.1.2.1.1.1. Tetrakloroetüleen (tihedus 1,62)****2.1.2.1.2. Värvimisreaktiiv****2.1.2.1.2.1. Alisariinpunase lahus (lahjendada 2,5 ml 1 M soolhapet 100 ml vees ja lisada saadud lahusele 200 mg alisariinpunast)****2.1.2.1.3. Kinnitid****2.1.2.1.3.1. Leelis (NaOH 2,5 % w/v või KOH 2,5 % w/v)****2.1.2.1.3.2. Glütserool (lahjendamata, viskoossus: 1 490 cP)****2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoossus: 1 200 cP) või vaik, millel on nimetatud vahendiga võrdväärsed omadused objektiklaasil püsipreparaadi valmistamiseks.****2.1.2.1.4. Värvivate omadustega kinnitid****2.1.2.1.4.1. Lugoli lahus (lahustada 2 g kaaliumjodiidi 100 ml vees ja lisada pidevalt loksutades 1 g joodi)**

<sup>(1)</sup> <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Tsüstiini määramise reaktiiv (2 g pliiatsetaati, 10 g NaOH 100 ml vees)
- 2.1.2.1.4.3. Fehlingi reaktiiv (valmistatakse enne kasutamist põhilahuste A ja B võrdsetest kogustest (1/1). Lahus A: lahustada 6,9 g vask(II)sulfaatpentahüdraati 100 ml vees. Lahus B: lahustada 34,6 g kaaliumnaatriumtartaraattetrahüdraati ja 12 g NaOH 100 ml vees)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametüülbensidiin/vesinikperoksiid (lahustada 1 g 3,3',5,5' tetrametüülbensidiini (TMB) 100 ml jäääädikhappes ja 150 ml vees. Enne kasutamist segada 4 osa saadud TMB lahust 1 osa 3-protsendilise vesinikperoksiidiga)
- 2.1.2.1.5. Loputusained
- 2.1.2.1.5.1. Etanool  $\geq 96\%$  (tehniline)
- 2.1.2.1.5.2. Atsetoon (tehniline)
- 2.1.2.1.6. Pleegitav reaktiiv
- 2.1.2.1.6.1. Kaubanduslik naatriumhüpokloriti lahus (9–14 % aktiivkloori)
- 2.1.2.2. Seadmed
- 2.1.2.2.1. Analüütiline kaal täpsusega 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Jahvatusseade: jahvatusveski või uhmer
- 2.1.2.2.3. 0,25 mm ja 1 mm ruudukujuliste võrguavadega sõelad
- 2.1.2.2.4. 250 ml kooniline klaasist jaotuslehter, mille koonuse põhjas on teflonist või lihvklaasist korkkraan. Korkkraani ava läbimõõt peab olema  $\geq 4$  mm. Alternatiivina võib kasutada koonilise põhjaga selitusklaasi, kui labor on tõestanud, et tuvastatav kontsentratsioon on sama kui koonilise klaasist jaotuslehtri kasutamise puhul.

Jaotuslehter



- 2.1.2.2.5. Vähemalt 6,5–40-kordse suurendusvahemikuga stereomikroskoop
- 2.1.2.2.6. Vähemalt 100–400-kordse suurendusvahemikuga kombineeritud mikroskoop, mida saab kasutada vaatluseks läbiva valgusega valg välja meetodil. Lisaks võib kasutada polariseeritud valgust ja diferentsiaalset interferentskontrasti
- 2.1.2.2.7. Tavalised klaasist laborinõud
- 2.1.2.2.8. Vaatluspreparaadi valmistamise vahendid: tavalised mikroskoobi objektiklaasid, süvendiga objektiklaasid, katteklaidid (20 × 20 mm), pintsetid, õhuke spaatel
- 2.1.3. Proovi võtmine ja ettevalmistamine
- 2.1.3.1. Proovi võtmine
- Määramiseks kasutatakse I lisa sätete kohaselt võetud representatiivset proovi.

## 2.1.3.2. Ettevaatusabinõud

Laboratoorse ristsaastumise vältimiseks tuleb kõik taaskasutatavad seadmed enne kasutamist hoolikalt puhastada. Jaotuslehtri osad tuleb enne puhastamist lahti võtta. Jaotuslehtri osad ja klaasnõud pestakse kõigepealt käitsi ja seejärel pesumasinas. Sõelu tuleb puhastada jäikade harjastega sünteetilise harjaga. Pärast rasvaste materjalide, näiteks kalajahu sõelumist on soovitatav sõelu puhastada atsetooni ja suruõhuga.

## 2.1.3.3. Muude kui rasva- ja õliproovide ettevalmistamine

2.1.3.3.1. Proovide kuivatamine: proovid niiskusesisaldusega > 14 % kuivatatakse enne käitlemist.2.1.3.3.2. Proovide eelsõelumine: 1 mm granuleeritud söötasid ja seemneid on soovitatav eelsõeluda ja seejärel valmistada saadud kaks fraktsiooni ette ja analüüsida eraldi proovidena.2.1.3.3.3. Osaproovide võtmine ja peenestamine: vähemalt 50 g proovist võetakse analüüsimiseks ja peenestatakse.2.1.3.3.4. Sademe ekstraheerimine ja ettevalmistamine: 10 g (täpsusega 0,01 g) suurune kogus jahvatatud osaproovist pannakse jaotuslehtrisse või koonilise põhjaga selitusklaasi ja lisatakse 50 ml tetrakloroetüleen. Lehtrisse viidav kogus on maksimaalselt 3 g, kui tegemist on kalajahu või muu puhtalt loomse saaduse, mineraalse komponendi või eelseguga, mis tekitab rohkem kui 10 % sadet. Segu lõksutatakse tugevasti vähemalt 30 sekundit ja seejärel lisatakse ettevaatlikult veel vähemalt 50 ml tetrakloroetüleen, loputades sellega lehtri sisepinda, et eemaldada kõik sellele jäänud osakesed. Saadud segul lastakse seista vähemalt 5 minutit, enne kui sade eraldatakse korkkraani avamisega.

Koonilise põhjaga selitusklaasi kasutamisel segatakse segu tugevasti vähemalt 15 sekundit ja pestakse klaasi sisepinnalt vähemalt 10 ml tetrakloroetüleeniga hoolikalt maha kõik kinni jäänud osakesed. Segul lastakse 3 minutit seista ja segatakse uuesti 15 sekundit ning pestakse klaasi sisepinnalt vähemalt 10 ml puhta tetrakloroetüleeniga hoolikalt maha kõik kinni jäänud osakesed. Saadud segul lastakse seista vähemalt 5 minutit ning seejärel vedel osa eemaldatakse ja valatakse ära hoolika dekanteerimisega, jälgides, et sade jääks täielikult alles.

Sade kuivatatakse ja seejärel kaalutakse (täpsusega 0,001 g). Kui rohkem kui 5 % sademest koosneb osakesetest suurusega > 0,50 mm, sõelutakse sade 0,25 mm sõelaga ja uuritakse kahte saadud fraktsiooni.

2.1.3.3.5. Heljumi ekstraheerimine ja ettevalmistamine: pärast sademe eraldamist eespool kirjeldatud meetodi abil peab jaotuslehtrisse jääma kaks faasi: vedel faas, mis koosneb tetrakloroetüleenist, ja heljumist saadud tahke faas. Tahke faas on heljum ja selle saamiseks lastakse tetrakloroetüleen lehtrist täielikult välja korkkraani avamisega. Jaotuslehter pööratakse ümber ja valatakse heljum suurde Petri tassi ning kuivatatakse õhu käes tõmbe all. Kui heljumis on rohkem kui 5 % osakesi suurusega > 0,50 mm, sõelutakse see 0,25 mm sõelaga ja uuritakse mõlemat saadud fraktsiooni.2.1.3.3.6. Lähtematerjali ettevalmistamine: valmistatakse ette vähemalt 5 g suurune jahvatatud osaproov. Kui rohkem kui 5 % materjalist koosneb osakestest suurusega > 0,50 mm, sõelutakse see 0,25 mm sõelaga ja uuritakse mõlemat saadud fraktsiooni.

## 2.1.3.4. Rasvast ja õlist koosnevate proovide ettevalmistamine

Rasvast ja õlist koosnevate proovide ettevalmistamiseks võib kasutada järgmist eeskirja:

— kui rasv on tahke, soojendatakse seda ahjus kuni vedeldumiseni;

— pipeti abil viiakse 40 ml rasva või õli proovi põhjast tsentrifuugitopsi;

— tsentrifuugitakse 10 minutit kiirusel 4 000 p/min;

— kui rasv on pärast tsentrifuugimist tahke, soojendatakse seda ahjus kuni vedeldumiseni;

— tsentrifuugimist korratakse 5 minutit kiirusel 4 000 p/min;

— väikese lusika või spaatli abil viiakse pool dekanteeritud lisanditest uurimiseks mikroskoobi objektiklaasile, kinnitina soovitatakse kasutada glütserooli;

— ülejäänud lisandeid kasutatakse sademe ettevalmistamiseks vastavalt punktile 2.1.3.3.

#### 2.1.3.5. Värvimisreaktiivide kasutamine

Loomset päritolu osakeste nõuetekohase kindlakstegemise hõlbustamiseks võib katse teostaja kasutada proovide ettevalmistamisel värvimisreaktiive kooskõlas EURL-AP koostatud juhistega, mis on avaldatud labori veebisaidil.

Kui sademe värvimiseks kasutatakse alisariinpunase lahust, kasutatakse järgmist eeskirja:

— kuivatatud sade pannakse katseklaasi ja loputatakse kaks korda umbes 5 ml etanooliga (iga kord kasutatakse pööriseajat 30 sekundit, lahustil lastakse umbes üks minut ja 30 sekundit settida ja lahusti kallatakse ära);

— sade pleegitatakse vähemalt 1 ml naatriumhüpokloriti lahuse lisamisega. Reaktsioonil lastakse kesta 10 minutit. Katseklaas täidetakse veega, sademel lastakse 2–3 minutit settida ning vesi ja suspendeeritud osakesed kallatakse ettevaatlikult ära;

— sadet loputatakse veel kaks korda umbes 10 ml veega (kummalgi korral kasutatakse pööriseajat 30 sekundit, lastakse settida ja vesi kallatakse ära);

— lisatakse 2–10 tilka alisariinpunase lahust ja segu segatakse pööriseajaga. Reaktsioonil lastakse kesta 30 sekundit ja värvitud sadet loputatakse kaks korda umbes 5 ml etanooliga ja seejärel üks kord atsetooniga (iga kord kasutatakse pööriseajat 30 sekundit, lahustil lastakse umbes 1 minut selgida ja kallatakse ära);

— värvitud sade kuivatatakse.

#### 2.1.4. Mikroskoopiline uurimine

##### 2.1.4.1. Vaatluspreparaadi ettevalmistamine

Sademest ja katse teostaja valikul kas heljumist või lähteainest valmistatakse vaatluspreparaadid. Kui proovi ettevalmistamisel on kasutatud sõelumist, valmistatakse vaatluspreparaadid kahest saadud fraktsioonist (peenem ja jämedam fraktsioon). Objektiklaasidele määratud fraktsioonide näidised peavad olema terve fraktsiooni suhtes esindavad.

On vaja ette valmistada piisav arv vaatluspreparaate, et tagada punktis 2.1.4.2 esitatud uurimiseeskirja täies ulatuses teostamine.

Vaatluspreparaadid peavad olema kinnitatud nõuetekohaste kinnitite abil vastavalt EURL-AP standardsele töökorrale, mis on avaldatud labori veebisaidil. Vaatluspreparaadid peavad olema kaetud katteklaasidega.

##### 2.1.4.2. Vaatluseeskirjad loomse päritoluga osakeste tuvastamiseks segajõusöödas ja söödamaterjalis

Ettevalmistatud vaatluspreparaate vaadeldakse vastavalt vaatluseeskirjadele, mis on esitatud joonisel 1 (muu segajõusööt) ja söödamaterjalid kui puhas kalajahu) või joonisel 2 (kalajahu).

Sademe mikroskoobiga vaatlemiseks kasutatakse kombineeritud mikroskoopi ja katse teostaja valikust sõltuvalt uuritakse kas heljumit või lähtematerjali. Jämedama fraktsiooni uurimiseks võib peale kombineeritud mikroskoobi kasutada ka stereomikroskoopi. Kõiki vaatluspreparaate uuritakse põhjalikult, kasutades erinevaid suurendusi.

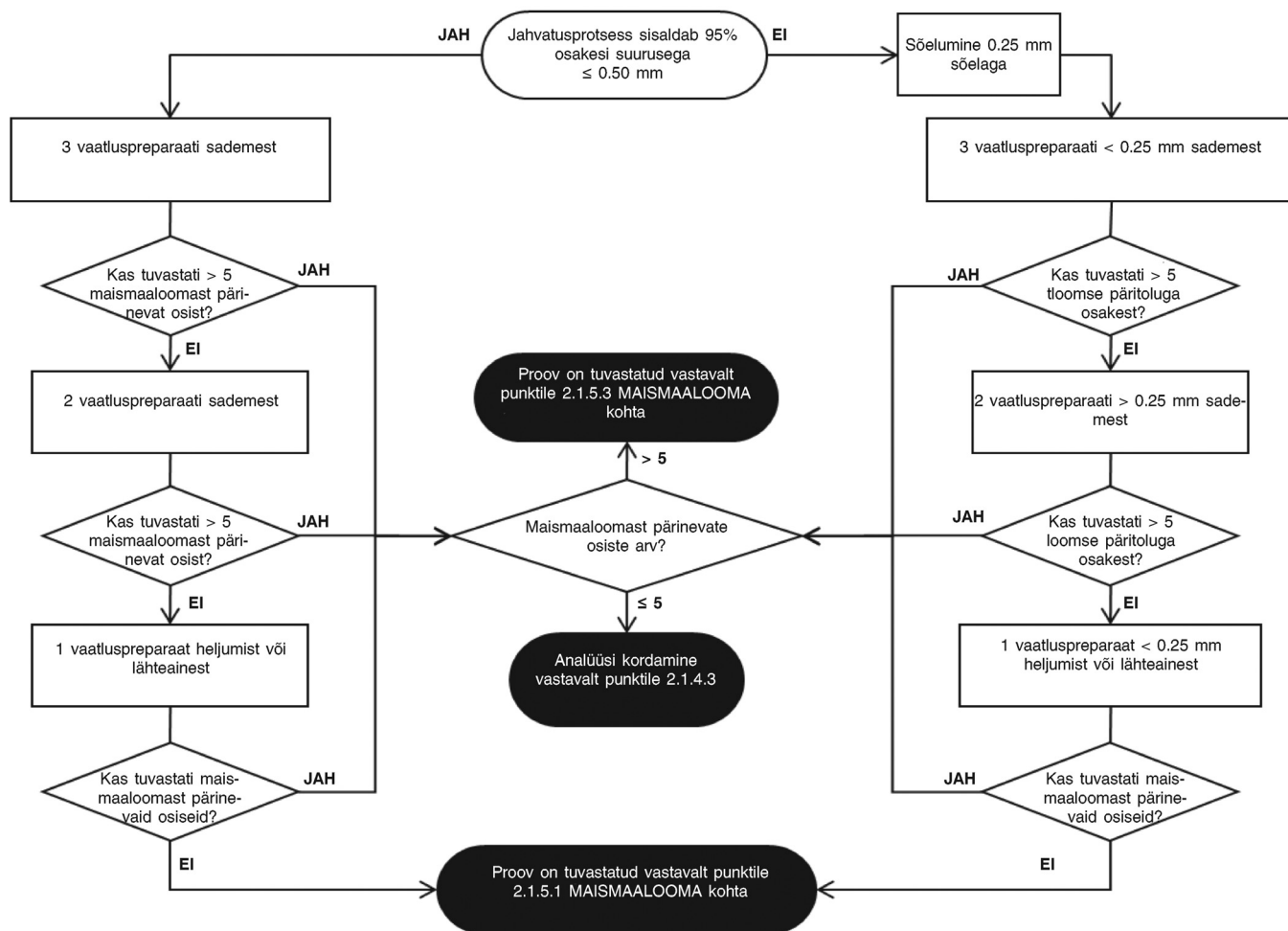
Vaatluseeskirja iga etapi jaoks kehtestatud vaatluspreparaatide miinimumarvust tuleb rangelt kinni pidada, välja arvatud juhul, kui kogu fraktsiooni materjalist ei ole võimalik saada nõutavat arvu vaatluspreparaate. Ühe määramise jaoks vaadeldakse kuni kuut vaatluspreparaati.

Katse teostaja võib osakeste laadi ja päritolu kindlakstegemise hõlbustamiseks kasutada abivahendeid, näiteks otsustamise tugisüsteeme, fotoarhiive ja etalonproove.



Joonis 2

## Vaatluseeskirjad loomse päritoluga osakeste tuvastamiseks kalajahus





#### 2.1.4.3. Määramiste arv

Kui joonistel 1 ja 2 esitatud vaatluseeskirjade kohase esimese määramise tulemusena ei tuvastata ühtki maismaaloomast või kalast saadud loomse päritoluga osakest, ei ole täiendav määramine vajalik ja analüüsi tulemus väljendatakse punktis 2.1.5.1 esitatud näidislausete abil.

Kui joonisel 1 või 2 esitatud vaatluseeskirjade kohase esimese määramise tulemusena tuvastatud (maismaaloomast või kalast saadud) osakeste arv jääb vahemikku 1–5, tehakse teine määramine uuest 50 g osaproovist. Kui teisel määramisel jääb kõnealust laadi loomse päritoluga osakeste arv vahemikku 0–5, väljendatakse analüüsi tulemus punktis 2.1.5.2 esitatud näidislausete abil või tehakse kolmas määramine uuest 50 g osaproovist. Kui pärast esimest ja teist määramist on kahe määramisega tuvastatud kõnealust laadi osakeste summa suurem kui 15, ei ole täiendavat määramist vaja teha ja analüüsi tulemus väljendatakse punktis 2.1.5.3 esitatud näidislausete abil. Kui pärast kolmandat määramist on kolme määramisega tuvastatud kõnealust laadi loomse päritoluga osakeste summa suurem kui 15, väljendatakse analüüsi tulemus punktis 2.1.5.3 esitatud näidislausete abil. Muudel juhtudel väljendatakse analüüsi tulemus punktis 2.1.5.2 esitatud näidislausete abil.

Kui joonisel 1 või 2 esitatud vaatluseeskirjade kohase esimese määramise tulemusena tuvastatakse rohkem kui 5 maismaaloomast või kalast pärinevat loomse päritoluga osakest, väljendatakse analüüsi tulemus punktis 2.1.5.3 esitatud näidislausete abil.

#### 2.1.5. Tulemuste väljendamine

Tulemuste esitamisel teatab labor, millist tüüpi materjali analüüsiti (sade, heljum või lähteaine) ja mitu määramist tehti.

Labori aruanne peab sisaldama vähemalt teavet maismaaloomadest ja kalajahust pärinevate osakeste olemasolu kohta.

Erinevad tulemused esitatakse järgmiselt.

##### 2.1.5.1. Ei tuvastatud ühtki kõnealust laadi loomse päritoluga osakest:

— valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis maismaaloomadest saadud osakesi,

— valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis kalast saadud osakesi.

##### 2.1.5.2. Tuvastati keskmiselt 1–5 loomse päritoluga osakest:

— valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovist rohkem kui viis maismaaloomadest saadud osakest ühe määramise kohta keskmiselt. Osakesed määratleti kui ... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv ...]. Selline väga väike sisaldus, mis on allpool mikroskoopilise meetodi avastamispiiri, tähendab, et ei saa välistada valepositiivse tulemuse võimalust.

Või, vastavalt vajadusele,

— valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovist rohkem kui viis kalast saadud osakest ühe määramise kohta keskmiselt. Osakesed määratleti kui ... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus ...]. Selline väga väike sisaldus, mis on allpool mikroskoopilise meetodi avastamispiiri, tähendab, et ei saa välistada valepositiivse tulemuse võimalust.

Proovi eelsõelumise puhul märgib labor, millises fraktsioonis (sõelutud fraktsioon, granuleeritud fraktsioon või seemned) on tuvastatud loomse päritoluga osakesi, kuna ainult sõelutud fraktsioonist tuvastatud loomse päritoluga osakesed võivad tähendada keskkonna saastumist.

##### 2.1.5.3. Tuvastati keskmiselt rohkem kui viis loomse päritoluga osakest:

— valgusmikroskoopia abil tuvastati analüüsimiseks esitatud proovist rohkem kui viis maismaaloomadest saadud osakest ühe määramise kohta keskmiselt. Osakesed määratleti kui ... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv ...].

Või, vastavalt vajadusele,

- valgusmikroskoopia abil tuvastati analüüsimiseks esitatud proovist rohkem kui viis kalast saadud osakest ühe määramise kohta keskmiselt. Osakesed määratleti kui ... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus ...].

Proovi eelsõelumise puhul märgib labor, millises fraktsioonis (sõelutud fraktsioon, granuleeritud fraktsioon või seemned) on tuvastatud loomse päritoluga osakesi, kuna ainult sõelutud fraktsioonist tuvastatud loomse päritoluga osakesed võivad tähendada keskkonna saastumist.

## 2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

### 2.2.1. Põhimõte

Loomse päritoluga desoksüribonukleiinhappe (DNA) fragmendid, mis võivad esineda söödamaterjalides ja segajõusöödas, tuvastatakse polümeraasi ahelreaktsiooni abil geeni kordistamise meetodiga, mis on suunatud liigispetsiifilise DNA-järjestuse tuvastamisele.

PCR-meetodi puhul on kõigepealt nõutav DNA eraldamine. Selliselt saadud DNAGA tehakse geeni kordistamine, et tuvastada katsega kontrollitavaid loomaliike.

### 2.2.2. Reaktiivid ja seadmed

#### 2.2.2.1. Reaktiivid

##### 2.2.2.1.1. DNA eraldamise reaktiivid

Kasutatakse ainult EURL-AP labori poolt heaks kiidetud ja labori veebisaidil avaldatud reaktiive.

##### 2.2.2.1.2. Geeni kordistamise reaktiivid

##### 2.2.2.1.2.1. Primerid ja sondid

Kasutatakse ainult EURL-AP poolt valideeritud oligonukleotiidide järjestusega primereid ja sonde <sup>(1)</sup>.

##### 2.2.2.1.2.2. Master Mix

Kasutatakse ainult neid Master Mix'i lahuseid, mis ei sisalda reaktiive, mis loomse DNA juuresoleku tõttu võivad anda vale tulemuse <sup>(2)</sup>.

##### 2.2.2.1.2.3. Saastusest puhastamise reaktiivid

##### 2.2.2.1.2.3.1. Soolhappe lahus (0,1N).

##### 2.2.2.1.2.3.2. Pleegitav reaktiiv (0,15 % aktiivklooriga naatriumhüpokloriti lahus)

##### 2.2.2.1.2.3.3. Kallite seadmete, nagu analüütiliste kaalude (näiteks MP Biomedicals DNA Erase<sup>TM</sup>) saastusest puhastamiseks ettenähtud mittesöövitavad reaktiivid

#### 2.2.2.2. Seadmed

##### 2.2.2.2.1. Analüütilised kaalud täpsusega 0,001 g

##### 2.2.2.2.2. Jahvatusseadmed

##### 2.2.2.2.3. Reaalajas PCR tegemist võimaldav termotsükler

##### 2.2.2.2.4. Mikrotsentrifuug mikrotsentrifuugitopside jaoks

##### 2.2.2.2.5. 1 µl – 1 000 µl pipeteerimist võimaldavad mikropipetid

##### 2.2.2.2.6. Standardsed plastikust molekulaarbioloogia vahendid: mikrotsentrifuugitopsid, mikropipettide filtriga plastikotsikud, termotsükleri plaadid.

##### 2.2.2.2.7. Proovide ja reaktiivide hoidmiseks ettenähtud külmikud

<sup>(1)</sup> Iga uuritava loomaliigi jaoks olemasolevate primerite ja sondide loeteluga saab tutvuda EURL-AP veebisaidil.

<sup>(2)</sup> Vajalike Master Mix'i lahuste näited on esitatud EURL-AP veebisaidil.

- 2.2.3. *Proovi võtmine ja proovi ettevalmistamine*
- 2.2.3.1. *Proovi võtmine*  
Määramiseks kasutatakse I lisa kohaselt võetud representatiivset proovi.
- 2.2.3.2. *Proovi ettevalmistamine*  
Laboriproovide ettevalmistamine kuni DNA eraldamiseni teostatakse vastavalt II lisas sätestatud nõuetele. Vähemalt 50 g proovist võetakse analüüsimiseks osaproovid ja peenestatakse.  
  
Proovi ettevalmistamine teostatakse muudes ruumides kui DNA eraldamiseks ja geeni kordistamiseks ettenähtud ruumid vastavalt standardile ISO 24276.  
  
Ette valmistatakse kaks proovi suurusega vähemalt 100 mg.
- 2.2.4. *DNA eraldamine*  
Iga proovi DNA eraldatakse vastavalt ELi referentlabori EURL-AP kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale.  
  
Iga eraldamise puhul tehakse kaks eraldamise kontrollkatset vastavalt standardile ISO 24276:  
— eraldamise tühikatse,  
— DNA eraldamise positiivne kontrollkatse.
- 2.2.5. *Geeni kordistamine*  
Geeni kordistamine teostatakse kõikide kontrollimist vajavate liikide jaoks valideeritud meetodite abil. Need meetodid on esitatud ELi referentlabori EURL-AP poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardses töökorras. Iga eraldatud DNA-proovi analüüsitakse vähemalt kahe erineva lahjendusega, et hinnata inhibeerimist.  
  
Iga sihtliigi kohta tehakse kaks kordistamise kontrollkatset vastavalt standardis ISO 24276 kirjeldatud meetodile:  
— igal plaadil või PCR-katsete seerias kasutatakse sihtliigi DNA positiivset kontrolli;  
— igal plaadil või PCR-katsete seerias kasutatakse kordistusreaktiivi kontrolli (mida nimetatakse ka matriitsita kontrolliks).
- 2.2.6. *Tulemuste tõlgendamine ja esitamine*  
Tulemuste esitamisel teatab labor vähemalt kasutatud proovide massi, kasutatud ekstraheerimismeetodi, teostatud määramiste arvu ja meetodi avastamispiiri.  
  
Tulemusi ei tõlgendata ega esitata, kui DNA eraldamise positiivne kontrollproov ja DNA positiivne sihtkontrollproov ei anna katsega kontrollitava sihtliigi puhul positiivseid tulemusi, samas kui kordistamisreaktiivi kontroll on negatiivne.  
  
Kui kahe proovi tulemused ei ole kooskõlas, korratakse vähemalt geeni kordistamist. Kui labor kahtlustab, et nimetatud lahkuminek põhjuseks võib olla DNA eraldamine, tehakse enne tulemuste tõlgendamist uus DNA eraldamine ja seejärel geeni kordistamine.  
  
Tulemuste lõplik väljendamine peab põhinema kahe proovi tulemuste ühendamisel ja tõlgendamisel vastavalt ELi referentlabori EURL-AP poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale.
- 2.2.6.1. *Negatiivne tulemus*  
Negatiivne tulemus esitatakse järgmiselt:  
  
Analüüsimiseks esitatud proovis ei tuvastatud Xst pärinevat DNAd (X on katsega kontrollitav loomaliik või liikide rühm).
- 2.2.6.2. *Positiivne tulemus*  
Positiivne tulemus esitatakse järgmiselt:  
  
Analüüsimiseks esitatud proovis tuvastati Xst pärinev DNA (X on katsega kontrollitav loomaliik või liikide rühm)."
-