

KOMISSION DIREKTIIVI 2003/126/EY,
annettu 23 päivänä joulukuuta 2003,
analyysimenetelmästä eläinperäisten ainesosien määrittämiseksi rehujen virallista tarkastusta varten
(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määrittämenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin 70/373/ETY⁽¹⁾ ja erityisesti sen 2 artiklan

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Direktiivin 70/373/ETY mukaisesti rehujen viralliset tarkastukset sen todentamiseksi, onko rehujen laatua ja koostumusta koskevia lakeja, asetuksia ja hallinnollisia määräyksiä noudatettu, on suoritettava käyttäen yhteisön näytteenotto- ja määrittämenetelmiä.
- (2) Rehujen pakkausmerkintää koskevien säännösten samoin kuin tiettyntyyppisten eläinproteiinien käytön tiettyjen eläinryhmien rehussa kieltävien vaatimusten vuoksi näiden proteiinien havaitsemiseen ja tarvittaessa niiden prosenttiosuuden määrittämiseen tarvitaan luotettavia analyysimenetelmiä.
- (3) Eläinperäisten ainesosien mikroskooppisen tutkimuksen ja arvioinnin suuntaviivoista rehujen virallista tarkastusta varten 13 päivänä marraskuuta 1998 annettu komission direktiivi 98/88/EY⁽²⁾ on tätä nykyä ainoa validoitu menetelmä, jolla voidaan selvittää, esiintyykö rehuissa eläinproteiineja, myös siinä tapauksessa, että niitä on käsitelty 133 °C:n lämpötilassa ja 3 baarin paineessa 20 minuutin ajan.
- (4) Prosessoitujen eläinproteiinien määrittämiseen liittyvässä hiljattaisessa vertailututkimuksessa osoittautui, että direktiivissä 98/88/EY säädettyjen mikroskooppisten testien soveltamisessa esiintyvä vaihtelu aiheutti merkittäviä eroja menetelmän herkkyydessä, spesifisyydessä ja tarkkuudessa. Prosessoitujen eläinproteiinien määrittämisen yhdenmukaistamiseksi ja parantamiseksi olisi täsmennettävä mikroskooppista menetelmää koskevia säännöksiä ja tehtävä niistä pakollisia. On tarpeen varmistaa, että menetelmää käyttävillä analyytikoilla on riittävä koulutus, koska menetelmän tehokkuus riippuu analyytikon taidoista.
- (5) Direktiivi 98/88/EY olisi sen vuoksi korvattava.
- (6) Tässä direktiivissä säädetty toimenpiteet ovat elintarviketjua ja eläinten terveyttä käsittelevän pysyvän komitean lausunnon mukaiset,

1 artikla

Jäsenvaltioiden on säädettävä, että kun rehujen virallista valvontaa toteutetaan rehuissa mahdollisesti olevien eläinperäisten ainesosien esiintymisen, tunnistamisen ja/tai niiden määrän arvioimiseksi neuvoston direktiivin 95/53/EY⁽³⁾ mukaisen rehujen yhteensovitetun tarkastusohjelman yhteydessä, valvonnassa noudatetaan tämän direktiivin liitteessä olevia säännöksiä.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on varmistettava, että eläinproteiinien esiintymistä rehuissa koskevaa virallista valvontaa suorittavat laboratoriot osallistuvat määrääjain analyysimenetelmien ulkoisiin vertailumittauksiin ja että analyysitekevä laboratoriohenkilöstö saa riittävän koulutuksen.

3 artikla

Kumotaan direktiivi 98/88/EY.

Viittauksia kumottuun direktiiviin pidetään viittauksina tähän direktiiviin.

4 artikla

1. Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä heinäkuuta 2004. Niiden on viipymättä toimitettava komissiolle kyseiset säännökset sekä kyseisten säännösten ja tämän direktiivin säännösten välinen vastaavuustaulukko.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitettuja kysymyksistä antamansa kansalliset säännökset kirjallisina komissiolle.

⁽¹⁾ EYVL L 170, 3.8.1970, s. 2, direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 807/2003 (EUVL L 122, 16.5.2003, s. 36).

⁽²⁾ EYVL L 318, 27.11.1998, s. 45.

⁽³⁾ EYVL L 265, 8.11.1995, s. 17, direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 2001/46/EY (EYVL L 234, 1.9.2001, s. 55).

5 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

6 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 23 päivänä joulukuuta 2003.

Komission puolesta

David BYRNE

Komission jäsen

LIITE

Rehujen eläinperäisten ainesosien mikroskooppiseen toteamiseen, tunnistamiseen tai arviointiin sovellettavat edellytykset**1. Tavoite ja soveltamisala**

Näitä edellytyksiä on sovellettava, kun eläinperäisiä ainesosia (jotka on määritelty nisäkkäiden, siipikarjan ja kalojen ruhojen tai ruhon osien käsittelystä saataviksi tuotteiksi) tutkitaan rehuista mikroskooppisesti neuvoston direktiivin 95/53/EY mukaisen rehujen yhteensovitettun tarkastusohjelman yhteydessä. Mikäli tässä liitteessä kuvattuja menetelmiä käytetään kaikissa virallisissa analyyseissa, ylimääräinen analyysi voidaan tehdä poikkeavaa tai vaihtoehtoista menetelmää käyttäen, jotta voitaisiin parantaa eräiden eläinperäisten ainesosien havaitsemista tai täsmentää eläinperäisten ainesosien alkuperää. Poikkeavaa analysointimenettelyä voidaan lisäksi käyttää tutkittaessa erityisiä eläinperäisiä ainesosia, esimerkiksi plasmata tai luita talissa (ks. myös kohta 9), kunhan nämä analyysit ovat yhteensovitetussa tarkastusohjelmassa määrättyjen analyysien lisäksi tehtäviä analyyseja.

2. Herkkyys

Eläinperäisten ainesosien luonteesta riippuen niitä voidaan havaita rehuista hyvinkin pieniä määriä (< 0,1 %).

3. Periaate

Tutkimukseen käytetään asianmukaisesti esikäsittelyä, edustavaa näytettä, joka on otettu yhteisön näytteenottomenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 1 päivänä maaliskuuta 1976 annetun komission direktiivin 76/371/ETY⁽¹⁾ säännösten mukaisesti. Tämä analyysimenetelmä soveltuu rehunäytteille, joiden kosteuspitoisuus on alhainen. Jos rehun kosteuspitoisuus ylittää 14 prosenttia, se on ennen käsittelyä kuivattava (kondensoitava). Eräitä rehuja tai rehuaineita (esim. rasvoja ja öljyjä) varten tarvitaan erityiskäsittelyä (ks. kohta 9). Eläinperäiset ainesosat tunnistetaan tyypillisten mikroskooppisesti tunnistettavissa olevien ominaisuuksien (lihassäikeiden ja muiden lihan osien, ruston, luiden, sarvien, karvojen, harjasten, veren, höyhenten, munankuorten, kalanluiden ja suomujen) perusteella. Tutkimus on tehtävä sekä näytteen siiviläfraktiosta (6.1) että rikastetusta sedimentistä (6.2).

4. Reagenssit**4.1 Mikroskopointireagenssit****4.1.1 Kloraalihydraatti (60 % vesiliuos, w/v)****4.1.2 Lipeä (NaOH 2,5 % w/v tai KOH 2,5 % w/v) siiviläfraktiota varten****4.1.3 Parafiiniöljy tai glyseroli (viskositeetti 68—81) sedimentistä tehtäviä mikroskooppihavaintoja varten****4.2 Pesureagenssit****4.2.1 Etanoli, 96 %****4.2.2 Asetoni****4.3 Konsentroitireagenssi****4.3.1 Tetrakloorietyleeni (tiheys 1,62)****4.4 Värjäysreagenssit****4.4.1 Jodi-kaliumjodidiliuos (2 g kaliumjodidia liuotetaan 100 ml:aan vettä ja lisätään 1 g jodia, samalla sekoitetaan voimakkaasti)****4.4.2 Alitsariinipunainen (2,5 ml 1 M suolahappoa laimennetaan 100 ml:aan vettä ja liuokseen lisätään 200 mg alitsariinipunaista)****4.4.3 Kystiiniireagenssi (2 g lyijyasetaattia ja 10 g NaOH:ta liuotetaan 100 ml:aan vettä)****4.4.4 Jodi-kaliumjodidiliuos (liuotettu 70-prosenttiseen etanoliin)**

⁽¹⁾ EYVL L 102, 15.4.1976, s. 1.

4.5 Värinpoistoreagenssi

4.5.1 Tavallista natriumhypokloriittiliuosta (9,6 % aktiivista klooria)

5. Laitteet ja tarvikkeet

5.1 Analysivaaka (tarkkuus 0,01 g; rikastettua sedimenttiä varten 0,001 g)

5.2 Jauhamisvälineet (mylly tai huumare, erityisesti rehulle, jonka rasvapitoisuus analyysissa on yli 15 %)

5.3 Seula, jossa on neliönmuotoiset reiät, silmäkoko enintään 0,50 mm

5.4 Erotussuppilo tai kartiopohjainen selkeytysastia

5.5 Stereomikroskooppi (vähintään 40-kertainen suurennus)

5.6 Valomikroskooppi (vähintään 400-kertainen suurennus), jossa on läpivalaisu- tai polarisaatio-optiikka

5.7 Tavanomaiset laboratorion lasiastiat.

Kaikki välineet on puhdistettava huolellisesti. Erotussuppilot ja lasiastiat on pestävä pesukoneessa. Seulat on puhdistettava jäykkäharjaisella harjalla.

6. Suoritus

Pelletöidyt rehut voidaan esiseuloa, jos molemmat saadut fraktiot analysoidaan erillisinä näytteinä.

Näytettä käsitellään vähintään 50 g (tarvittaessa se jauhetaan huolellisesti sopivilla jauhamisvälineillä (5.2) sopivan rakenteen aikaansaamiseksi). Jauhetusta materiaalista otetaan kaksi edustavaa osanäytettä, yksi seulafraktiota (vähintään 5 g, ks. kohta 6.1) ja yksi rikastettava sedimenttiä varten (vähintään 5 g, ks. kohta 6.2). Lisäksi voidaan käyttää värjäysreagenssia (6.3) tunnistamista varten.

Eläinproteiinien luonteen ja partikkelien alkuperän osoittamiseksi voidaan käyttää päätöksentekoa tukevaa järjestelmää (kuten ARIES) ja dokumentoida referenssinäytteitä.

6.1 Eläinperäisten ainesosien osoittaminen seulafraktioista

Vähintään 5 g näytettä seulotaan (seulasta ks. kohta 5.3) kahteen fraktioon.

Karkea seulafraktio (tai edustava osa sitä) levitetään ohuena kerroksena sopivalle alustalle ja tutkitaan järjestelmällisesti stereomikroskoopilla (5.5) eri suurennuksilla eläinperäisten ainesosien osoittamiseksi.

Hienoa seulafraktiota laitetaan objektilasille ja tutkitaan järjestelmällisesti valomikroskoopissa (5.6) eri suurennuksilla eläinperäisten ainesosien osoittamiseksi.

6.2 Eläinperäisten ainesosien osoittaminen rikastetusta sedimentistä

Vähintään 5 g näytettä punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella erotussuppiloon tai kartiopohjaiseen selkeytysastiaan ja lisätään vähintään 50 ml tetrakloorietyleenä (4.3.1). Seosta ravistetaan tai sekoitetaan toistuvasti.

— Käytettäessä suljettua erotussuppiloa sedimentin annetaan laskeutua suppilon pohjalle riittävän kauan (vähintään 3 minuuttia), ennen kuin sedimentti erotetaan. Suppiloa ravistetaan uudelleen, ja sedimentin annetaan jälleen laskeutua vähintään 3 minuuttia. Tämän jälkeen sedimentti erotetaan.

— Käytettäessä avointa selkeytysastiaa sedimentin annetaan laskeutua astian pohjalle vähintään 5 minuuttia, minkä jälkeen se erotetaan.

Koko sedimentti kuivataan ja punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella. Punnitus on tarpeen vain, jos eläinperäisten ainesosien osuus on arvioitava. Jos sedimentti koostuu useista suurista partikkeleista, se voidaan seuloa (seulasta ks. kohta 5.3) kahteen fraktioon. Kuivattu sedimentti tutkitaan stereomikroskoopilla (5.5) tai valomikroskoopilla (5.6) luuaineksen toteamiseksi.

6.3 Mikroskopiointi- ja värjäysreagenssien käyttö

Eläinperäisten ainesosien mikroskooppisessa tunnistuksessa voidaan käyttää erityisiä mikroskopiointi- ja värjäysreagensseja.

- Kloraalihydraatti (4.1.1): Varovainen kuumennus helpottaa solurakenteiden tarkastelua, koska tärkkelysjyvät gelatinoituvat ja ei-toivottu solun sisältö hajoaa.
- Lipeä (4.1.2): Natrium- tai kaliumhydroksidi kirkastaa rehumateriaalia, mikä helpottaa lihassäikeiden, karvojen ja muiden keratiinirakenteiden havaitsemista.
- Parafiiniöljy ja glyseroli (4.1.3): Luuaines voidaan tunnistaa helposti, koska useimmat luun ontelot (lakuunat) jäävät täyteen ilmaa ja näkyvät mustina noin 5—15 mikrometrin kokoisina reikinä.
- Jodi-kaliumjodidiliuos (4.4.1): Liuosta käytetään tärkkelyksen (sinivioletti väri) ja valkuaisen (keltaoranssi väri) havaitsemisen apuna. Liuosta voidaan tarvittaessa laimentaa.
- Alitsariinipunaliuos (4.2.2): Liuos värjää luut, ruodot ja suomet punaisiksi tai vaaleanpunaisiksi. Ennen sedimentin kuivaamista (ks. kohta 6.2) koko sedimentti siirretään lasiseen koeputkeen ja pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (4.2.1) (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta ja annetaan liuottimen selkeytyä noin minuutin ajan ennen sen dekantointia). Ennen alitsariinipunaliuoksen käyttöä sedimentti käsitellään värinpoistoreagenssilla. Sedimenttiin lisätään vähintään 1 ml natriumhypokloriittiliuosta (4.5.1), ja reaktion annetaan jatkua 10 minuutin ajan. Putki täytetään vedellä, sedimentin annetaan laskeutua 2—3 minuuttia, ja sen jälkeen vesi ja suspendoituneet partikkelit dekantoidaan. Sedimentti pestään vielä kahdesti noin 10 ml:lla vettä (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta, sedimentin annetaan laskeutua putken pohjaan ja vesi dekantoidaan). Lisätään alitsariinipunaliuosta vähintään kahdesta kymmeneen tippaa (sedimentin määrän mukaan). Seosta ravistetaan, ja sedimentin annetaan reagoida liuoksen kanssa muutaman sekunnin ajan. Värjäytynyt sedimentti pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (4.2.1) ja sen jälkeen kerran asetonilla (4.2.2) (joka kerta käytetään koeputkisekoitinta ja sedimentin annetaan laskeutua noin minuutin ajan, minkä jälkeen liuos dekantoidaan). Tämän jälkeen sedimentti on valmista kuivattavaksi.
- Kystiiniireagenssi (4.4.3): Varovainen kuumennus muuttaa kystiiniä sisältävät ainesosat (karvat, höyhenet jne.) mustanruskeiksi.

6.4 Kalajauhoa mahdollisesti sisältävän rehun tutkiminen

Vähintään yksi objektilasi hienosta seulafraktiosta ja hienosta sedimenttifraktiosta tutkitaan valomikroskoopilla (ks. kohdat 6.1 ja 6.2).

Jos rehu pakkausmerkintöjen mukaan sisältää kalajauhoa tai jos kalajauhon esiintymistä epäillään tai sitä havaitaan alustavassa tutkimuksessa, mikroskopoidaan lisäksi vähintään kaksi uutta objektilasia alkuperäisen näytteen hienosta seulafraktiosta ja koko sedimenttifraktiosta.

7. Laskutoimitukset ja arviointi

Kun virallisella analyysillä arvioidaan eläinperäisten ainesosien määrää (eikä vain niiden esiintymistä), jäsenvaltioiden on varmistettava, että käytetään tässä kohdassa kuvattuja menettelyjä.

Laskutoimitukset voidaan tehdä vain, jos eläinperäiset ainesosat sisältävät luupartikkeleita.

Lämminveristen maalla elävien lajien (ts. nisäkkäiden ja lintujen) luupartikkelit voidaan erottaa erityyppisistä kalaluista mikroskooppisesti tyypillisten ontelomuodostelmien (lakuunoiden) perusteella. Näytteen sisältämän eläinperäisen aineksen osuus arvioidaan ottamalla huomioon

- luupartikkelien arvioitu osuus (painoprosenttia) rikastetussa sedimentissä ja
- luun osuus (painoprosenttia) eläinperäisissä ainesosissa.

Arvion on perustuttava vähintään kolmeen (jos mahdollista) objektilasilliseen näytettä ja vähintään viiteen näkökenttään objektilasia kohti. Rehuseoksista saatu rikastettu sedimentti sisältää yleensä maaeläinten luupartikkelien ja kalanluupartikkelien lisäksi muita raskaita partikkeleita kuten mineraaleja, hiekkaa, ligniiniä sisältäviä kasvinosia yms.

7.1 Luupartikkelien osuuden arvioitu määrä

prosenttia maaeläinten luupartikkeleita = $(S \times c) / W$

prosenttia kalanluu- ja suomupartikkeleita = $(S \times d) / W$

[S = sedimentin paino (mg), c = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien maaeläimistä peräisin olevien luiden arvioitua osuutta varten, d = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien kalanruotojen ja suomujen arvioitua osuutta varten ja W = sedimentointia varten punnittu näyte (mg).]

7.2 Eläinperäisten ainesosien arvioitu osuus

Luun osuus eläinkunnan tuotteissa voi vaihdella paljon. (Luu jauho sisältää luuta tavallisesti 50—60 % ja lihajauho 20—30 %; kalajauhossa luiden ja suomujen osuus vaihtelee kalajauhon tyypin ja alkuperän mukaan ja on tavallisesti 10—20 %.)

Jos näytteen sisältämä eläinperäinen jauho tiedetään, sen osuus näytteestä voidaan arvioida:

Maaeläinperäisten ainesosien arvioitu osuus (%) = $(S \times c) / (W \times f) \times 100$

Kalatuotteiden arvioitu osuus (%) = $(S \times d) / (W \times f) \times 100$

[S = sedimentin paino (mg), c = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien maaeläimistä peräisin olevien luiden arvioitua osuutta varten, d = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien kalanruotojen ja suomujen arvioitua osuutta varten, f = korjauskerroin näytteen eläinperäisten ainesosien sisältämien luiden osuutta varten ja W = sedimentointia varten punnittu näyte (mg).]

8. Tutkimuksen tulosten esittäminen

Raportin on vähintään sisällettävä tieto maaeläimistä ja kalajauhosta peräisin olevien ainesosien esiintymisestä. Tulokset esitetään seuraavasti:

8.1 Maaeläimistä peräisin olevien ainesosien esiintyminen:

— Mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu maaeläimistä peräisin olevia ainesosia,

tai

— mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin maaeläimistä peräisin olevia ainesosia.

8.2 Kalajauhon esiintyminen:

— Mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kaloista peräisin olevia ainesosia,

tai

— mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin kaloista peräisin olevia ainesosia.

Jos kaloista tai maaeläimistä peräisin olevia ainesosia todetaan, tutkimusraportissa voidaan tarvittaessa esittää arvio havaittujen ainesosien osuudesta (x %, < 0,1 %, 0,1—0,5 %, 0,5—5 % tai > 5 %) ja täsmentää — jos mahdollista — kyseessä olevan maaeläimen tyyppi ja havaitut eläinperäiset ainesosat (lihassäikeet, rusto, luu, sarvet, karvat, harjakset, höyhenet, veri, munankuoret, kalanluut, suomut).

Esitettäessä arvio eläinperäisten ainesosien osasta käytetty korjauskerroin f on mainittava.

Kun havaitaan maaeläinten luuainesta, raporttiin on lisättävä seuraava maininta:

"Mahdollisuutta, että edellä mainitut ainesosat ovat peräisin nisäkkäistä, ei voida jättää huomiotta."

Tämä maininta ei ole tarpeen, jos maaeläinten luupartikkelit on täsmennetty siipikarjan tai nisäkkäiden luupartikkeleiksi.

9. **Vaihtoehtoinen menettely rasvan tai öljyn analysointiin**

Seuraavaa menettelyä voidaan käyttää rasvan tai öljyn analysoinnissa:

- Jos rasva on kiinteää, sitä lämmitetään esimerkiksi mikroaaltouunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.
 - 40 ml rasvaa pipetoidaan näytteen pohjaosasta sentrifugiputkeen.
 - Sentrifugoidaan 4 000 kierrosta minuutissa (rpm) 10 minuuttia.
 - Jos rasva on jähmettynyt sentrifugoinnin aikana, sitä lämmitetään taas mikroaaltouunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi. Sentrifugoidaan uudestaan 4 000 kierrosta minuutissa (rpm) 5 minuuttia.
 - Puolet dekantoiduista epäpuhtauksista siirretään pienellä lusikalla tai spaattelilla petrimaljaan tai objektilasille mahdollisten eläinperäisten ainesosien (lihassäikeiden, höyhenten, luunpalasten jne.) mikroskooppista tutkimusta varten. Mikroskopiinnissa käytettäväksi mikroskopointireagenssiksi suositellaan parafiiniöljyä tai glyserolia.
 - Loput epäpuhtauksista käytetään sedimentointiin kohdassa 6.2 kuvatulla tavalla.
-